TRATAT DE MEDICINĂ INTERNĂ

HEMATOLOGIE

Sub redacţia prof. RADU PĂUN

PARTEA I

Coordonator: prof. DAN COLIŢĂ

EDITURA MEDICALĂ — BUCUREŞTI, 1997

TABLA DE MATERII

Prefață 11

I. ȚESUTUL SANGUIN. UNITATE STRUCTURALĂ, FUNCȚIONALĂ ȘI EMBRIOLOGICĂ (de Acad. prof. dr. doc. **St. Berceanu**) 13

Introducere 13
Concepția actuală asupra unicității țesutului sanguin 16
Structura funcțională a compartimentelor țestutului sanguin 18

II. HEMATOPOIEZA (de **G. Grigoriu, Tatiana Pușcariu**) 28

Celulele hematopoietice 28
Celulele stem hematopoietice pluripotente (CSP) 30
Celule progenitoare 32
Micromediul hematopoietic 36
Factorii reglatori ai hematopoiezei 39
Factorii inhibitori ai hematopoiezei 51
Cinetica hematopoiezei 52
Migrarea celulelor stem și a progenitorilor hematopoietici 55
Hematopoieza embriofetală 57
Patologia hematopoiezei 59
Utilizarea factorilor stimulatori ai hematopoiezei în patologie 63

III. SERIA ERITROCITARĂ (de **Al. Vâlcu**) 68

Eritropoieza 68
Eritrocitul 78
Structura 78
Mediul intern al eritrocitului 83
Funcția respiratorie a eritrocitului 85
Morfologia și constantele eritrocitare normale 85
Variațiile și anomaliile morfologice și funcționale ale eritrocitelor . . 89
1. Variații de mărime 89
2. Variații de culoare 91
3. Variații de formă 92
4. Incluziile eritrocitare 94
Hemoliza 96
Mecanisme și determinări experimentale ale hemolizei 97
Mecanisme de hemoliză potologică 99

IV. METABOLISMUL FIERULUI (de **N. Munteanu**) 103

Cantitatea totală de fier. Comportamentele fiziologice ale fierului. Natura chimică 103
Balanța fierului 104
Ciclul fierului 108

V. METABOLISMUL ENZIMOENERGETIC AL ERITROCITELOR (de **Ilie Marcu**) 121

VI. HEMOGLOBINELE NORMALE. STRUCTURĂ, SINTEZĂ, FUNCȚIE (de **C. Predescu**) 131

VII. SERIILE GRANULOCITARE (de **G. Grigoriu**) 146

Seria granulocitară neutrofilă 146
Morfologia granulocitelor neutrofile 146

Ciclul de viață . . . 150
Reglarea granulopoiezei neutrofile . . . 151
Funcțiile granulocitelor neutrofile . . . 153
Patologia granulocitelor neutrofile . . . 157
Anomalii cantitative . . . 157
Anomalii calitative . . . 160
Anomalii congenitale . . . 160
Anomalii de structură celulară . . . 161
Anomalii dobândite . . . 162
Seria granulocitară eozinofilă . . . 163
Morfologia granulocitelor eozinofile . . . 163
Cinetica eozinofilelor . . . 165
Funcțiile granulocitelor eozinofile . . . 165
Patologia granulocitelor eozinofile . . . 166
Seria granulocitară bazofilă . . . 168
Morfologia granulocitelor bazofile . . . 168
Ciclul de viață . . . 170
Funcțiile granulocitelor bazofile și mastocitelor . . . 170
Patologia granulocitelor bazofile . . . 174
VIII. SERIA MONOCITO-MACROFAGICĂ (de **S. Nicoară**) . . . 178
Morfologia . . . 180
Ciclul de viață . . . 185
Funcții . . . 190
Modificări patologice . . . 198
IX. SERIA MEGACARIOCITOTROMBOCITARĂ (de **Adriana Coliță**) . . . 202
Ciclul de viață . . . 203
Structura . . . 209
Markeri ai megacariocitelor . . . 211
Funcțiile trombocitelor . . . 215
Patologia trombocitelor . . . 227
X. SERIA LIMFOPLASMOCITARĂ (de **Ioana Răileanu-Moțoiu**) . . . 232
Morfologie . . . 233
Citochimie . . . 235
Fenotipul imun . . . 237
Grupele limfocitare . . . 239
Limfopoieza normală . . . 241
Circulația și durata de viață a limfocitelor . . . 254
Funcțiile limfocitelor și plasmocitelor . . . 256
Răspunsul imun normal . . . 266
Modificări numerice și structurale ale limfocitelor și plasmocitelor . . . 276
XI. PLASMA SANGUINĂ (de **C. Poppa, Florica Enache**) . . . 280
Rolul plasmei în organism . . . 280
Caracterele fizice ale plasmei . . . 282
Compoziția plasmei . . . 285
Constituenții anorganici ai plasmei . . . 285
Apa . . . 285
Sărurile minerale . . . 288
Constituenții organici ai plasmei . . . 296
Substanțe diverse . . . 310
XII. IMUNOGLOBULINELE (de **Ileana Funduc**) . . . 312
Structura generală . . . 312
Heterogenitatea imunoglobulinelor . . . 314
Rolul biologic al domeniilor imunoglobulinelor . . . 316
Structura și activitatea biologică a claselor de imunoglobuline . . . 317
Biosinteza imunoglobulinelor . . . 323
Catabolismul imunoglobulinelor . . . 324
XIII. SISTEMUL COMPLEMENT (de **Ileana Dima**) . . . 326
Proteinele complementului . . . 327
Activarea complementului . . . 331
Consecințe biologice ale activării complementului . . . 343

Controlul și reglarea activității complementului 349
Rolul complementului în patologie 349
Explorarea sistemului complement 349
XIV. HOMEOSTAZIA HEMOSTAZEI (de **C. Poppa, Florica Enache**) . . . 353
Hemostaza 354
Fibrinoliza 386
XV. GRUPELE SANGUINE (de **Maria Danielescu**) 404
Grupele sanguine eritrocitare 404
Sistemul 0AB 406
Sistemul secretor 412
Sistemul Lewis 413
Sistemul Rhesus 414
Sistemul MNS_sU 423
Sistemul P 425
Sistemul Keel 426
Sistemul Duffy 429
Sistemul Lutheran 430
Sistemul Kidd 431
Sistemul Ii 432
Grupele trombocitare 433
Sistemele serice 434
XVI. SISTEMUL HLA (de **Doina Iiinca**) 438
Genetică 440
Sisteme genetice diferite de sistemul HLA localizate pe cromosomul 6 . 441
Sistemul major de histocompatibilitate la om 442
Alte gene localizate pe cromosomul 6 443
Proprietățile genelor sistemului HLA și descrierea locusurilor 443
Complexul major de histocompatibilitate și răspunsul imun 462
Implicații medicale ale sistemului HLA 465
XVII. ELEMENTE DE GENETICĂ NUCLEARĂ (de **Dan Coliță**) 487
Noțiuni introductive 487
Metode de analiză structurală 495
Modele lezionale 504
Contribuția geneticii moleculare la diagnosticul și monitorizarea hemopatiilor maligne 505
Impactul metodelor de analiză moleculară asupra diagnosticului clinic și prenatal al unor boli hematologice ereditare 511
XVIII. IMPLICAȚIILE GENETICII MENDELIENE ÎN HEMATOLOGIE (de **S. Nicoară, Andreea Moicean**) 515
Introducere 515
Istoric 516
Ereditatea monogenică sau mendeliană 516
Ereditatea autosomală dominantă 517
Boli hematologice cu ereditate autosomală dominantă 518
Ereditatea codominantă în hematologie 519
Ereditatea autosomală recesivă 520
Boli hematologice cu ereditate autosomală recesivă 521
Boli hematologice cu ereditate autosomală dominantă sau recesivă . . 523
Ereditatea dominantă legată de cromosomul X 525
Ereditatea recesivă legată de cromosomul X 526
Boli hematologice cu ereditate recesivă legată de cromosomul X (RX) . 527
XIX. ELEMENTE DE CITOGENETICĂ ÎN HEMOPATII MALIGNE (de **Ioana Moțoiu**) 534
Leucemia granulocitară cronică (LGC) 539
Leucemia acută mieloblastică **de novo** 541
Leucemia acută mieloblastică indusă de terapie 544
Sindroame cu potențial preleucemic 546
Sindroamele mielodisplazice 546
Policitemia vera 547
Limfoproliferările maligne 547
Leucemia acută limfoblastică 549

Limfoame maligne non-Hodgkin . . . 549
Limfomul Burkitt . . . 550
Limfoame foliculare . . . 550
Leucemia limfatică cronică . . . 551
Mielomul multiplu și leucemia plasmocitară . . . 551
Limfoproliferările T . . . 551
Boala Hodgkin . . . 553
XX. ANEMIILE. GENERALITĂȚI. CLASIFICARE (de **Dan Coliță**) . . . 556
XXI. ANEMIILE HIPOCROME (de **N. Munteanu**) . . . 568
Etiologie, patogenie și clasificare . . . 570
Investigații uzuale de laborator în anemiile hipocrome . . . 573
Anemii induse de tulburări în metabolismul fierului . . . 579
A. Anemia feriprivă (anemia prin deficit de fier, anemia prin carență de fier) . . . 579
B. Alte anemii hipocrome induse de tulburări în metabolismul fierului (repartiția anormală a fierului în compartimentele sale fiziologice) . 605
1. Tulburări în transportul fierului. Atransferinemie . . . 605
Atransferinemia congenitală . . . 605
Atransferinemii secundare . . . 606
Anemia prin deficit de cupru . . . 607
2. Tulburări în utilizarea fierului la nivelul membranei eritroblaștilor 607
Sindromul Shahidi—Nathan—Diamond . . . 607
3. Anomalii în depozitarea fierului . . . 608
Anemia din bolile cronice . . . 608
Hemosideroza pulmonară idiopatică . . . 611
Anemii sideroblastice (anemii hipocrome prin deficit în sinteza protoporfirinei, anemii sideroacrestice, anemii hipocrome hipersideremice) . . . 614
Anemii sideroblastice ereditare . . . 618
Anemie ereditară legată de sex . . . 618
Anemiile sideroblastice dobândite . . . 621
Anemia refractară sideroblastică idiopatică (ARSI) . . . 621
Anemii sideroblastice secundare . . . 623
Anemiile sideroblastice din bolile inflamatorii . . . 627
Anemiile sideroblastice în neoplazii de organ și hemopatii maligne 627
XXII. ANEMIILE MEGALOBLASTICE (de **T. Hossu**) . . . 630
Anemiile megaloblastice prin deficit de vitamina B12 . . . 631
Formele etiopatogenice și clinice ale deficitului de vitamina B12 . . . 636
Boala Addison—Biermer . . . 636
Alte anemii megaloblastice prin deficit de factor intrinsec . . . 646
Anemii megaloblastice prin tulburări de transport și utilizare a vitaminei B12 . . . 647
Anemii megaloblastice prin deficit de acid folic . . . 647
Anemii megaloblastice prin consum crescut de folați . . . 652
Anemii megaloblastice cu pierderi crescute și tulburări de depozitare a folaților . . . 653
Anemii megaloblastice prin tulburări de utilizare a folaților . . . 654
Anemii megaloblastice de alte cauze . . . 655
Principii de diagnostic și tratament în anemiile megaloblastice . . . 655
Diagnosticul etiopatogenic . . . 656
Tratamentul anemiilor megaloblastice . . . 658
XXIII. ANEMIILE APLASTICE (de **G. Grigoriu, Anca Popp**) . . . 661
Anemiile aplastice globale dobândite . . . 672
Anemia aplastică globală congenitală . . . 672
Anemiile medulare parțiale . . . 673
Aplazia eritroidă sau eritrocitară dobândită . . . 673
Aplazia eritroidă congenitală (anemia Diamond—Blackfan) . . . 674
Aplazia granulocitară dobândită sau agranulocitoza . . . 674
Aplazia granulocitară congenitală sau sindromul Schwachman—Diamond . . . 675

Aplazia megacariocitară dobândită sau purpura trombocitopenică amegacariocitară dobândită . . . 675
Aplazia megacariocitară congenitală sau sindromul trombocitopenic cu absența radiusului . . . 675
XXIV. ANEMIILE DISERITROPOIETICE CONGENITALE (de **Adriana Colița**) 689
Anemia diseritropoietică congenitală tip I . . . 691
Anemia diseritropoietică congenitală tip II . . . 691
Anemia diseritropoietică congenitală tip III . . . 691
XXV. ANEMIA POST-HEMORAGIE ACUTĂ (de **Dan Colița**) . . . 696
XXVI. ANEMIILE HEMOLITICE. MECANISME, CLASIFICARE, DIAGNOSTIC (de **Dan Colița**) . . . 702
XXVII. ANEMIILE HEMOLITICE PRIN DEFECT DE MEMBRANĂ (de **Al. Vâlcu**) . . . 712
Patologia rețelei interne (a scheletului de membrană) . . . 713
Sferocitoza ereditară . . . 713
Ovalocitoza sau eliptocitoza ereditară . . . 723
Piropoikilocitoza ereditară . . . 725
Anemii hemolitice intravasculare (brutale) anicterice . . . 727
Hemoglobinuria de marș . . . 727
Patologia stratului mediu (lipidic și lipoprotidic) al membranei . . . 728
Tulburări structurale ale stratului lipidic bilaminat . . . 728
Acantocitoza . . . 728
Acantocitoza în abetalipoproteinemia familială . . . 729
Acantocitoza ereditară fără abetaproteinemii . . . 729
Patologia lipoproteinelor integrate . . . 730
Stomatocitoza ereditară . . . 730
Xerocitoza erediară . . . 730
Patologia stratului superficial . . . 731
Boala grupului eritrocitar Rh nul . . . 731
XXVIII. HEMOGLOBINURIA PAROXISTICĂ NOCTURNĂ (de **Dan Colița**) 733
XXIX. HEMOGLOBINOPATIILE (de **C. Predescu**) . . . 745
Siclemia sau hemoglobinopatia S . . . 759
Alte hemoglobine anormale care produc hemoliză . . . 768
Hemoglobinopatia C . . . 768
Hemoglobinopatia D . . . 769
Hemoglobinopatia E . . . 770
Hemoglobinopatia O . . . 771
Hemoglobinele instabile . . . 772
Hemoglobinele anormale variante de HbF . . . 776
Hemoglobinele anormale variante de HbA_2 . . . 777
XXX. SINDROAMELE TALASEMICE (de **C. Predescu**) . . . 779
Beta-talasemia . . . 780
Alfa-talasemia . . . 798
Alte sindroame talasemice . . . 801
Sindroame talasemice minime . . . 801
Sindroame asemănătoare talasemiei . . . 801
Sindromul Lepore . . . 801
Persistența ereditară de HbF (PEHbF) . . . 802
XXXI. METHEMOGLOBINEMIILE (de **C. Predescu**) . . . 803
XXXII. ENZIMOPATIILE ERITROCITARE (de **J. Marcu**) . . . 812
Deficitul eritrocitar de glucozo-6-fosfat dehidrogenază . . . 813
Deficitul eritrocitar de piruvat kinază . . . 819
Alte enzimopatii eritrocitare . . . 821
XXXIII. ANEMIILE HEMOLITICE PROVOCATE DE AGENȚI INFECȚIOȘI, CHIMICI SAU FIZICI (de **Dan Colița**) . . . 823
Anemii hemolitice provocate de agenți infecțioși . . . 823
Anemii hemolitice provocate de agenți chimici . . . 828
Anemii hemolitice provocate de agenți fizici . . . 831

XXXIV. ANEMIILE HEMOLITICE PRIN FRAGMENTARE ERITROCITARĂ (de **Adriana Coliță**) . . . 833
Anemia hemolitică microangiopatică . . . 833
Anemia hemolitică mecanică la cardiaci . . . 842
XXXV. ANEMIILE HEMOLITICE PRIN MECANISME IMUNE (de **Dan Coliță, Ileana Dima**) . . . 846
Partenerii reacției imune . . . 847
Mecanismele hemolizei imune . . . 851
Anemii hemolitice (AH) induse de alloanticorpi (alloimune) . . . 858
Hemoliza posttransfuzională . . . 858
Incompatibilitatea feto-maternă: boala hemolitică a nou-născutului (BHNN) 862
Anemii hemolitice autoimune (AHAI) . . . 868
Anemii hemolitice autoimune (AHAI) cu auto-Atc la cald . . . 871
Anemii hemolitice autoimune (AHAI) cu auto-Atc activi la rece . . 875
Boala cu aglutinine la rece (BAR) . . . 875
Hemoglobinuria paroxistică **a frigore** . . . 877
Anemii hemolitice (AH) induse de medicamente . . . 877
XXXVI. PORFIRIILE (de **Al. Vâlcu**) . . . 881
Porfirii eritropoietice . . . 884
Porfiria eritropoietică congenitală (PEC) sau boala Günther . . . 884
Protoporfiria eritropoietică ereditară . . . 886
Porfirii hepatice . . . 888
Porfirii hepatice acute . . . 888
Porfiria acută intermitentă (PAI) . . . 888
Porfiria variegata (PV) . . . 893
Coproporfiria ereditară (CPE) . . . 894
Porfiria prin deficit de AAL dehidrază . . . 894
Profilaxia și tratamentul porfiriilor acute hepatice . . . 895
Porfirii hepatice cu modificări cronice . . . 899
Porfiria cutanată familială (tip II) . . . 899
Porfiria cutanată tardivă (tip I) . . . 899
Porfirii secundare . . . 902
Porfirii de origine toxică . . . 902
Porfiria „turcă"" . . . 902
Porfiria la populația africană Bantu . . . 902
Saturnismul . . . 903
Porfirii secundare unor boli endogene . . . 904
Anemii sideropenice . . . 904
Anemii sideroblastice . . . 905
XXXVII. HEMOCROMATOZE (de **Al. Vâlcu**) . . . 909
Hemocromatoza genetică (HG) sau ereditară . . . 909
Hemocromotoze secundare (hemosideroze) . . . 919
Hemocromatoza posttransfuzională . . . 919
Hemocromatoze în unele boli hematologice și metabolice . . . 920
Index . . . 925

I

ȚESUTUL SANGUIN. UNITATE STRUCTURALĂ, FUNCȚIONALĂ ȘI EMBRIOLOGICĂ

Acad. Prof. Dr. Doc. ȘT. BERCEANU

INTRODUCERE

Concepția unitară a țesutului sanguin structural și funcțional are o istorie relativ scurtă, de aproximativ 100 de ani, când s-au conturat științele morfologice și fiziologice în biologie și medicină pe baza tehnicilor moderne, în special cele microscopice; punerea la punct a coloranților de anilină, prin cercetările lui Paul Erlich la sfîrșitul secolului trecut, a constituit o etapă hotărâtoare în cunoașterea elementelor figurate ale sângelui.

Secole întregi, din antichitate și până în evul mediu, cu rădăcini mitologice și religioase în procesul de cunoaștere, s-a considerat că sângele este un fluid viu, un izvor al vieții, care — ca și creierul — ar fi deosebit de celelalte țesuturi. Mai târziu, când Aristotel introduce în cunoaștere metoda raționamentului logic, sângele apare — ca și alte domenii ale realității — ca un concept demonstrabil rațional în rudimentul de științe biologice elaborate de filozoful stagirist. Amprenta conceptuală mitic-filozofică, cu nuanțe uneori fantastice, a continuat și în evul mediu, până la fundamentarea științifică de cercetare introdusă de Bacon și apoi de Harvey, primul experimentator în cunoașterea circulației sanguine.

În a doua jumătate a secolului al XIX-lea se disting componentele centrală și periferică ale sângelui, precizându-se funcția de organ regenerator al măduvei osoase de către Neumann și Bizzozero, după 1860. Datorită cercetărilor sistematice de embriologie ale lui Maximov, spre

sfârșitul secolului, funcția de regenerare a organelor hematopoietice medulare și a ganglionilor limfatici se unifică într-o concepție unitară, după ce în prealabil cercetările lui Down, Ranvier, Feratta încercaseră să precizeze morfologia și funcția celulelor hematopoietice și a celor mezenchimale legate de regenerarea sângelui. În primul efort din secolul al XX-lea, Naegeli și Aschoff în Germania, Down în America, folosind observațiile de microscopie optică asupra sângelui normal și patologic, deschid cunoștințele moderne asupra anemiilor, leucemiilor și proliferărilor maligne ale sistemului reticuloendotelial, bine precizate de către Aschoff și Kyono în jurul anului 1925. Cu mai bine de jumătate de secol înainte, Virchow separase însă formele de leucemii mieloide de cele limfoide, conturând, astfel, liniile diferențiate ale țesutului sanguin, linia mieloidă cu origine în măduva osoasă și linia limfoidă, în ganglionii limfatici.

Dacă Neumann și Bizzozero, prin studii la cadavru, stabiliseră originea celulelor periferice în măduva osoasă, ipoteză criticată dar restabilită prin autoritatea lui Claude Bernard, Möschler efectuează primele cercetări pe măduva osoasă vie recoltată prin biopsie osoasă. În continuare, până la descoperirea mielogramei prin puncție medulară de către Arinkin în 1929, toate studiile de fiziologie funcțională și de patologie s-au făcut prin biopsii osoase sângerânde. Metodele avansate de diagnostic în bolile de sânge în ultimii 25—30 de ani au folosit studiul frotiului colorat după puncție medulară, dar reintroducerea punctiei bioptice, cu trocare speciale, în creasta iliacă mai ales, a reactualizat importanța studiului histologic al măduvei osoase ca țesut complex și aceasta trebuie pusă în practică în orice unitate specializată în hematologie.

Tratatele de hematologie, inclusiv cel românesc al lui N. Gh. Lupu și Mircea Petrescu (1936), au dezbătut concepția monofiletistă de hematopoieză, cu origine într-o singură celulă tânără, și concepțiile cu două sau mai multe celule, respectiv dualistă și polifiletistă, delimitându-se sindroamele proliferative ale componentelor mieloice (sindroame mieloproliferative) și proliferările limfoide (leucemii limfoide și limfoame). S-a ajuns la aceste separări prin studii de morfologie pe preparate fixate de sânge periferic, măduvă, ganglioni și splină, așa cum apar în lucrările clasice ale lui Maximov și Bloom, ale lui Down, Naegeli și, mai târziu, Heilmeyer, Fleischaker, precum și în primele ediții ale tratatului de hematologie al lui Wintrobe.

Preocupările deosebite asupra proceselor de proliferare și diferențiere, ca proprietăți specifice ale celulelor sanguine, au condus la introducerea de metode noi de studiu care abordează direct modificările și interrelațiile celulare prin tehnici *in vivo* (cele prin contrast de fază și colorații supravitale), iar după 1960 au apărut metodele de studiu în culturi de celule. Ceea ce remarcase Maximov prin preparate histologice fixate, urmărind zi de zi evoluția diferențierii organelor hematopoietice la embrioni, se verifică și se completează în culturi prin urmărirea condițiilor de proliferare și diferențiere a celulelor sanguine. De la metodele simple de culturi ale lui Carrel și ale lui Emil Crăciun pentru țesutul conjunctiv, s-a trecut la metode specializate pentru creșterea fragmentelor de măduvă osoasă (2, 3, 4, 16), după ce în prealabil Till și Mc Cullough urmăriseră liniile de creștere prin colonii *in vivo* în splina anima-

lelor iradiate. O contribuție remarcabilă, care a deschis o nouă cale de studiu al liniilor celulare, se datorește lui Metcalf și școlii sale de la Melbourne, după 1970, prin metoda microculturilor în medii semisolide. Tot ce s-a realizat în ultimii 15—20 de ani ca date fundamentale de hematologie normală și patologică, cu importante implicații practice, se datorește în special metodelor de culturi monocelulare în medii semisolide. Dezvoltarea metodelor de microscopie electronică și a cunoștințelor de biologie moleculară, precum și a metodelor de radiomarcare completează pe baze noi problemele actuale de hematologie, studiindu-se procesele de diferențiere și proliferare morfologică și cele funcționale celulare și moleculare. Descoperirea codului genetic de către Monod și Jacob, în jur de 1960, localizarea informației genetice în moleculele de ADN și introducerea concomitentă a determinării cariotipurilor de cromosomi au lămurit și lămuresc în continuare procesele de hematopoieză normală și deviațiile patologice maligne. Fenomenele de diferențiere, de la celula tânără multipotentă monomorfă din organele hematopoietice până la celulele înalt diferențiate — eritrocitele, granulocitele, trombocitele și limfocitele — caracterizate pe baze morfologice, se explică în prezent pe baze moleculare genetice, prin transmiterea ierarhică ADN-ARN-proteine-enzime. S-a precizat, prin aceste metode combinate, complexitatea fenomenelor de proliferare malignă, separându-se liniile celulare cu diferențiere limfoidă în organele din sistemul limfoid, ganglionul limfatic, de liniile eritromieloice și trombocitare cu origine în măduva osoasă (15).

Cea mai nouă achiziție în domeniul hematologiei și imunologiei constă în caracterizarea, pe baze de markeri și de receptori de membrane, a antigenelor proprii fiecărei linii celulare și etape de diferențiere. Deosebirile antigenice pe bază de markeri de membrană constituie caractere specifice pentru celulele malignizate în raport cu celulele normale. S-ar părea că cea mai valoroasă investigație — cel puțin în anumite situații patologice — este folosirea anticorpilor monoclonali, produși în prezent în cantități suficiente prin metodele de hibridizare celulară *in vitro*. Acestea au la bază transferul de informație genetică care determină trecerea unei structuri de la o celulă la o altă celulă, cu mare capacitate de proliferare și de secreție de imunoglobuline, cum sunt plasmocitele de mielom. Introducerea metodelor cu anticorpi monoclonali la noi în țară la Institutul V. Babeș, în colaborare cu Clinica de hematologie, București, a făcut posibilă efectuarea de adevărate „hărți" ale celulelor sanguine normale și patologice, cu deosebită importanță în diagnosticul unei anumite linii celulare și în prognosticul și răspunsul la tratament în leucemii și limfoame.

De o mare importanță în procesele de proliferare și diferențiere a celulelor hematopoietice normale și patologice sunt interleukinele, substanțe descoperite și studiate în ultimii 10 ani. Până în prezent sunt cunoscute circa 15 interleukine, dar numărul lor este în continuă creștere.

Fără a îngreuia metodologia de investigație a specialiștilor hematologi din laborator, care trebuie să folosească cu competență metodele morfologice pentru sângele periferic și pentru măduva osoasă, tehnicile și cunoștințele pentru diferențierea fenotipurilor de celule normale și patologice sunt necesare și trebuie recurs la ele, în unitățile specializate, în multe situații pe care le cere practica clinică a hematologiei, încă destul de dificilă.

CONCEPȚIA ACTUALĂ ASUPRA UNITĂȚII ȚESUTULUI SANGUIN

Sângele este considerat a fi un țesut mezenchimal cu origine embriologică în foaia mezoblastică, care se diferențiază din primele două luni ale fazei embrionare mezenchimale primitive localizate în cordoanele Wolf și Pander, din care se vor izola primele insule de țesut sanguin cu celule mezoblastice în lunile a 2-a—a 3-a ale fătului uman. Conceptul de țesut sanguin mezenchimal are, deci, baze embriologice prin evoluția diferențiată în dependență de ariile primitive vasculare, separându-se *compartimentul periferic* și *compartimentul central*, adică *sângele periferic* și *organele hematopoietice*. Sângele periferic este fluidul sanguin format din celulele înalt diferențiate care plutesc în mediul nutritiv, plasma, echivalent al substanței fundamentale a țesuturilor de origine mezenchimală. Organele hematopoietice delimitate în cursul dezvoltării embrionare pe același plan de celule și substanță fundamentală sunt ficatul și splina, active în perioada ulterioară, adică în lunile a 3-a—a 6-a de viață fetală; măduva osoasă, prezentă activ în toate oasele, se formează începând din lunile a 5-a—a 6-a și se dezvoltă definitiv în luna a 9-a, când hematopoieza hepatosplenică practic dispare.

Sistemul celulelor limfoide, care, într-o interpretare funcțională, reprezintă componenta principală a SCI (sistemul celular imun), se formează tot din celule mezenchimale primitive, celulele stem pentru tot țesutul hematopoietic; din măduva osoasă ele migrează în organele periferice: ganglionii limfatici, splina și țesutul limfoid al tubului digestiv. Planul de dezvoltare și diferențiere funcțională a limfocitelor este legat de contactul intim cu stroma de origine epitelială endodermală a buzunarelor care constituie timusul la mamifere și bursa lui Fabricius din cloaca intestinului terminal al păsărilor (fig. I.1). În prezent există un acord unanim că celulele limfoide derivă dintr-o celulă blastică nediferențiată comună și pentru sistemele sanguine mieloeritrocitare, conform concepției uniciste inițiale a lui Maximov, și confirmată în prezent mai ales prin cercetări asupra celulelor leucemice (6).

Unitatea țesutului sanguin, organe centrale și sânge periferic — cu componentele limfoide și mieloide, este susținută pe baza originii embriologice mezenchimale și prin procesele de proliferare și diferențiere de la o celulă comună până la celule înalt diferențiate din sângele periferic. O privire de ansamblu (vezi fig. I.1) înfățișează celula stem, comună sau separată de la o anumită fază în două celule hematopoietice, una pentru sistemul mieloid și alta pentru sistemul limfoid, și fazele de diferențiere, cu toate etapele succesive în organele hematopoietice centrale, până la celulele înalt diferențiate din sângele periferic.

Celulele diferențiate, ca eritrocite, granulocite, trombocite, părăsesc măduva osoasă și trec în sinusoidele vasculare, medulare, care le conduc în circulația generală. Există o caracteristică funcțională unitară, în felul ei unică, pentru țesutul sanguin: celulele sanguine se reproduc în organele centrale — măduvă osoasă sau ganglionii limfatici — prin funcțiile de proliferare mitotică și de diferențiere — maturație, prin

faze de dezvoltare care reproduc pentru fiecare generație fazele de dezvoltare embrionară ontogenetică, iar acestea reproduc pe cele filogenetice, ale istoriei îndelungate a dezvoltării speciei. Cele două funcții de proliferare și diferențiere, cu aceste caractere speciale pentru țesutul sanguin, constituie *hematopoieza*, adică generarea sau crearea (*poein*=

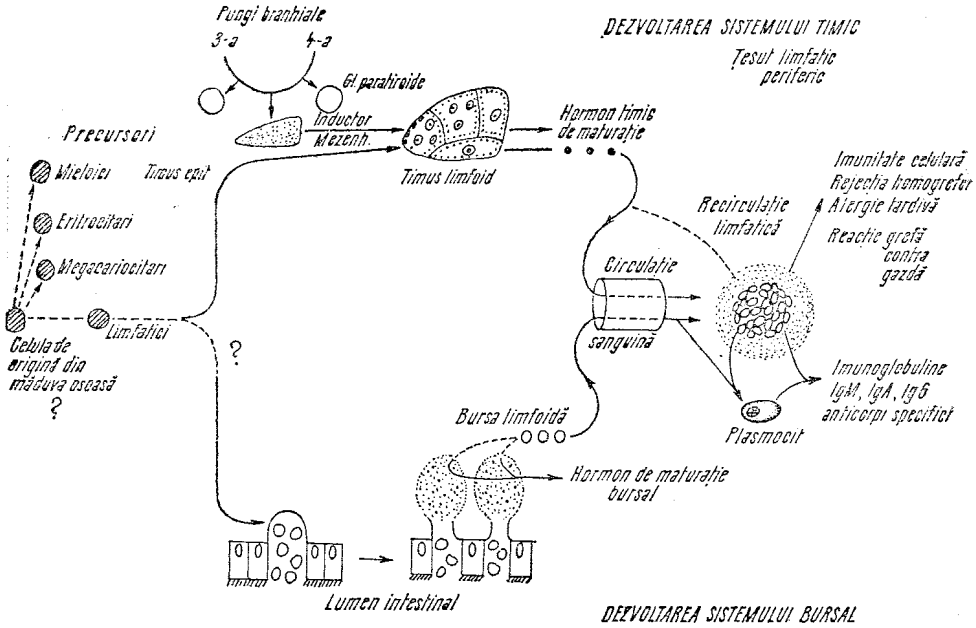


Fig. I.1. — Schema formațiunilor epitelio-mezenchimale care comandă hematopoieza la embrion cu timusul la mamifere și bursa Fabricius la păsări (după Hayer, 1968).

a crea) de noi celule sanguine. Se știe că în țesutul hepatic, de exemplu, regenerarea celulelor după o leziune toxică sau ischemică se face prin proliferarea mitotică de tip mitoză homeoplastică a celulelor hepatice restante: dintr-o celulă hepatică A se produc alte două celule hepatice fiice, A_1 și A_2, identice ca structură și funcție cu celula mamă A. În regenerarea eritrocitelor sau granulocitelor, în cadrul funcției generale de hematopoieză, este nevoie de o filiație de reproducere de la celula stem pluripotentă până la celula ultim diferențiată — eritrocit, granulocit etc. Fazele sunt cunoscute pentru fiecare serie în parte: pentru seria eritrocitară: proeritroblast, eritroblast bazofil, eritroblast policromatofil, eritroblast oxifil, reticulocit și eritrocit matur; pentru seria granulocitară: mieloblast, promielocit, mielocit, metamielocit, granulocit tânăr și granulocit adult. Celulele astfel diferențiate în măduva osoasă se descarcă prin *citodiabază*, a treia funcție hematopoietică, în sângele periferic prin dispozitivele sinusoidale. Atât în măduvă, cât și în ganglionii limfatici descărcarea se produce numai pentru celulele sanguine com-

plet diferențiate; prezența de celule tinere nediferențiate în sângele periferic constituie un semn de hematopoieză patologică, în general de proliferare malignă leucemică, ca în reacțiile după hemoliză și sângerări acute.

STRUCTURA FUNCȚIONALĂ A COMPARTIMENTELOR ȚESUTULUI SANGUIN

Țesutul sanguin cuprinde sângele periferic și organele hematopoietice: măduva osoasă și organele limfoide centrale: timusul, bursa lui Fabricius, și periferice: ganglionii limfatici, splina, țesutul limfoid digestiv.

Sângele periferic, evaluat global la 4,5—5 litri la adult, adică în medie 70—80 ml/kg corp, se compune din plasmă și din elementele figurate celulare. Plasma este mediul fluid care conține, dizolvate sau în suspensie, toate componentele biochimice moleculare ce asigură homeostazia organismului (electroliți, glucide, lipide, protide) și produsele de catabolism și anabolism pentru toate procesele fiziologice specifice fiecărui organ (vezi capitolul Plasma).

Celulele sanguine periferice sunt reprezentate de eritrocite sau globule roșii, de leucocite sau globule albe și de trombocite. După Erslev și Weiss (8), se produc zilnic 2,5 bilioane de eritrocite, 2,5 bilioane de trombocite și 1 bilion de granulocite/kg corp. Cu componentele celulare în plasmă, sângele are greutatea specifică 1 052—1 062. Prin sedimentare, după centrifugare în tubul de hematocrit, stratul celular se depune la fund — eritrocite 45% și deasupra plasma; un strat mic alb de leucocite și trombocite, abia vizibil, se găsește deasupra stratului roșu, reprezentând în jur de 1% din volumul sanguin. Cantitativ, pe mm^3, există 4,5 milioane de eritrocite, 6 000—10 000 de leucocite și 250 000—350 000 de trombocite.

Eritrocitele constituie aparatul celular sanguin care asigură respirația țesuturilor prin legarea de hemoglobină a O_2 și CO_2; se cunosc legile de saturație și disociație a hemoglobinei în funcție de concentrația acestor gaze la nivelul alveolelor pulmonare și capilarelor pulmonare și la nivelul țesuturilor. Eritrocitele sunt adulte, cu structură funcțională biconcavă, cu un anumit raport volum/suprafață, cu diametru și grosime care le asigură o durată de viață de 120 de zile, în condiții de mediu interior normal, ceea ce înseamnă, că pentru un volum de 4,5 l sânge și o concentrație de eritrocite de $5{,}2 \times 10^{12}$, în fiecare zi se pierd prin îmbătrânire și liză cam 10^{11} eritrocite și că aceeași cantitate de eritrocite trebuie să ajungă din măduva hematoformatoare în sânge. Metabolismul lor endogen, prin echipamentul enzimatic specific, asigură o glicoliză anaerobă ce furnizează energia necesară activității lor. Reticulocitele, eritrocite tinere de 24 de ore în sângele periferic, cu un raport de 1—2%, înlocuiesc un număr egal de eritrocite îmbătrânite și hemolizate în ficat și splină. Produsele de hemoliză sunt fierul, care se refolosește în eritropoieză și componentele de catabolism ale hemului, porfirinele și bilirubina.

Leucocitele sunt, în valoare normală, între 5 000 și 10 000/mm^3, repartizate procentual și în valoare absolută astfel: granulocitele polinucleate neutrofile 60—70% (4 000—5 000), granulocitele eozinofile 2—3% (200—250), granulocitele bazofile 0,5—1% (5—10), limfocitele 25% (1 500—2 500), monocitele 5% (300—500). Leucocitele se studiază curent pe frotiuri fixate și colorate cu metoda May Grünwald-Giemsa; se pot studia vii în microscopia cu contrast de fază și microscopia cu interferență.

Granulocitele posedă un echipament enzimatic de oxidoreducere pentru funcția de fagocitoză și putere bactericidă. Produse în măduva osoasă și descărcate în sângele periferic, rămân libere în circulație numai câteva ore (3, 6), după care se atașează prin fenomenul de marginație pe pereții capilarelor, constituind o rezervă de granulocite în sângele periferic, alături de rezerva matură disponibilă din măduva osoasă. Evaluate global, granulocitele și metamielocitele reprezintă în măduvă 5×10^9/kg corp; adăugându-se cele periferice, care reprezintă circa 1/16 din cele medulare, se apreciază la 5,5—6×10^9/kg corp granulocite în tot țesutul sanguin. Ele au o durată de viață în jur de 15 zile. Se apreciază că aproximativ 120×10^8 neutrofile se pierd pe zi și sunt înlocuite prin livrare în aceeași cantitate de către organele granulocitoformatoare.

Granulocitele eozinofile și bazofile sunt celule special adaptate răspunsului imun.

Monocitele sunt macrofagele sângelui periferic, cu o structură funcțională specifică, posedând esteraze, lizozim, mitocondrii, markeri și receptori de suprafață pentru captarea și prezentarea antigenelor în cadrul cooperării celulare imune. Sunt produse în măduva osoasă sub influența factorului stimulator de colonii, derivând dintr-o celulă blastică bipotențială, aceeași pentru geneza granulocitelor și monocitelor.

Limfocitele au fost considerate mult timp ca mononucleare diferențiate din limfoblast. În ultimii 25 de ani s-a precizat că limfocitele, deși apar omogene morfologic, cu coloratiile curente, constituie o populație polimorfă funcțional și structural, aparținînd SCI. După funcția în cadrul răspunsului imun și după originea lor, se disting limfocitele T (65—85% din toată populația) și limfocitele B (25—15%). Limfocitele T_3 timodependente, sunt situate în zonele paracorticale ale ganglionului limfatic și provin din organul imunitar central, timusul, sau se maturează sub influența acestuia, constituind după maturație celula care răspunde de imunitatea celulară.

După functia îndeplinită în cadrul răspunsului imun, se disting limfocitele T_h (*helper*=ajutător; inițiator) și limfocitele T_s (*suppressor*= inhibitor); există în plus limfocitul T_c, cu acțiune citotoxică în procesele imune. Cu ajutorul anticorpilor monoclonali se diferențiază în prezent toate aceste subpopulații de limfocite mature sau pe cale de maturare, cu receptori și markeri de suprafață diferiți. Există un raport între limfocitele T_h/T_s (T_4—T_8) de 1,6—2, important în aprecierea stărilor de deficit imun. În populația de limfocite se distinge, de asemenea, o celulă specială mare granulată *(large granular lymphocyte)*, care ar avea funcția de celulă NK *(natural killer)*, de ucigaș natural, importantă pentru apărarea imună anticanceroasă.

Limfocitul B, denumit astfel pentru că în cercetările embriologice pe anumite specii s-a văzut că derivă din bursa lui Fabricius (organ limfoepitelial, la păsări), derivă însă la mamifere din măduva osoasă *(bone marrow)*. Este celula activă în imunitatea umorală, răspunzând la stimulul T_h prin intermediul IL-2 după prezentarea antigenelor; IL-2 este o limfokină care produce proliferarea limfocitelor B și transformarea lor în plasmocite, celule producătoare de Ig-anticorpi. Limfocitele B se diferențiază în foliculii limfatici, și anume în centrii germinativi din ganglionii limfatici, dar se găsesc și în măduva osoasă, reprezentând în jur de 10% din celularitatea globală a măduvei. Ele au o durată de viață variabilă, de câteva săptămâni, pe când limfocitele T pot trăi mai mulți ani. Producerea lor, viteza de maturație și de proliferare în organele limfoide, ca și descărcarea lor periferică pentru angajare în răspunsul imun constituie un sistem cibernetic comandat genetic și declanșat printr-un derepresor, un stimulator, care este fie antigenul străin, fie, în condiții speciale, în bolile autoimune, un autoantigen.

Trombocitele sunt celulele cele mai mici ale sângelui, au durată de viață scurtă, de 5—8 zile, și sunt produse în măduva osoasă din citoplasma megacariocitelor. Concentrația lor în sânge este de 140—440 $\times$ 10^9/l și sunt consumate circa 150×10^9 pentru a asigura etanșeitatea patului vascular, cantitate care este înlocuită pornind de la megacariocitele medulare. Trombocitele au o structură simplă, însă bine adaptată funcției lor în relația cu endoteliul vascular în procesul coagulării.

Măduva osoasă este componenta centrală generatoare de celule sanguine mieloice: eritrocite, granulocite, monocite, trombocite. Pentru înțelegerea funcțiilor sale hematopoietice — *proliferare, diferențiere și citodiabază* — sunt necesare câteva noțiuni sumare asupra structurii măduvei osoase.

Măduva osoasă (m.o.) este formată dintr-o stromă reticulovasculară, care constituie rețeaua de susținere, de nutriție și de circulație a celulelor hematopoietice care formează parenchimul medular. Reacția reciprocă continuă dintre parenchim și stromă condiționează funcțiile de hematopoieză, fapt dovedit în ultimii ani, prin culturi *in vitro*, de către Metcalf și școala sa (12) după 1970 și urmărite și de noi chiar mai înainte (2, 3, 4). Această structură stromală și parenchimatoasă a m.o. este situată în cavitățile medulare ale oaselor lungi și ale oaselor scurte și plate. La copil, până la 18 ani, măduva activă roșie se găsește în toate cavitățile oaselor lungi sau scurte. După această vârstă, în cavitățile oaselor lungi măduva devine grasă, galbenă și pierde funcția hematopoietică; măduva roșie rămâne în oasele scurte și plate, evaluabilă pe această întindere cam la 1 500—2 000 g, adică aproximativ greutatea ficatului la adult. Celulele grase apar în măduvă încă de la 4 ani și, dezvoltându-se, vor constitui, la vârste după 18 ani, măduva grasă din cavitățile oaselor lungi, precum și din epifizele proximale ale femurului și humerusului. Cavitățile osoase constituie 1,4% din greutatea corpului la naștere și 4,8% la adult, pe când volumul sanguin scade de la 8%, la 7% (18).

Luând sternul ca tip de os hematopoietic pentru o înțelegere funcțională a structurilor sale, se distinge o compactă anterioară și una posterioară (fig. I.2) iar între acestea osul spongios, cu cavități determinate de lamele osoase întretăiate și anastomozate și legate de o parte

și de alta de cele două compacte. Într-o schemă simplă, utilă celui ce face o puncție sternală, se vede că acul pătrunde în compacta anterioară și ajunge în lacunele medulare de unde, prin aspirație, sunt extrase celulele parenchimului hematopoietic (1).

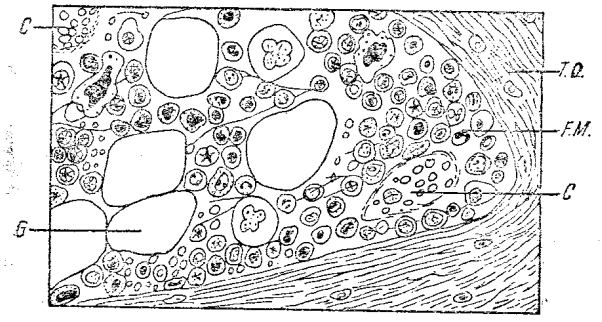


Fig. I.2. — Schema structurii măduvei osoase cu componenta osoasă și focar de hematopoieză:
C — capilar sanguin; G — depozite de grăsime; T.O. — travee osoasă; F.M. — focar de mielopoieză.

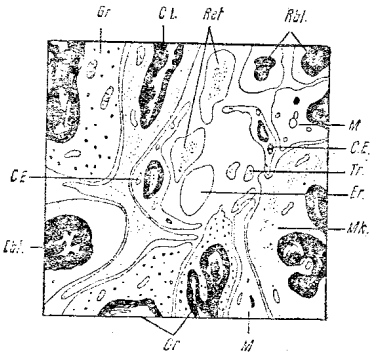


Fig. I.3. — Structura sinusului medular (după Bryon, 1968):
Ebl. — eritroblast; C.E. — celulă endotelială; Gr. — granulocit; C.I. — celulă interstițială; M — macrofag; Tr. — trombocit; Mk. — megacariocit; Er. — eritrocit.

Lacunele osoase sunt ocupate de stroma fibrelor de precolagen, fibrele de reticulină, colorabile cu săruri de argint și invizibile la colorațiile histologice obișnuite. La întretăierile fibrelor de reticulină ale rețelei se găsesc celule mari reticulare, considerate celule mezenchimale primitive cu potențial hematopoietic (2). Aceste celule sunt de fapt macrofage cu funcție trofică, capabile să secrete factori hematopoietici în cadrul relației parenchim—stromă. Ele aparțin, astfel, stromei mezenchimale nutritive, așa cum o dovedește și *in vitro* stratul de celule macrofage și fibroblastice, acel *feed-layer* (3, 12).

O componentă specială a rețelei stromale o constituie dispozitivele de sinusoide vasculare anastomozate și legate de circulația arterială a osului prin rețeaua de capilare din cavități. Sinusoidele, cu un strat de fibre de reticulină în exterior și cu celule endoteliale care au aceeași origine și aceeași funcție ca și macrofagele reticulare, se adună în fiecare cavitate într-un sinus central, care face legătura cu circulația generală prin venele spongioase.

Parenchimul medular este format din celule active, constituind insule de hematopoieză, așezate, în general, în jurul unei celule trofice cu funcție de celulă „doică" *(nurse)*. Loutit și Lajtha au arătat că aceste celule, care centrează insulele hematopoietice, nu sunt celule-sușe, ci celule trofice foarte active în hematopoieză pentru fiecare linie celulară.

În eritropoieză ele înmagazinează fierul, pe care-l predau prin dispozitive speciale citoplasmatice eritroblaștilor dispuși în jurul lor ca insule de eritropoieză. În mielo- și megacariopoieză ele secretă factori stimulatori, puși în evidență inițial de Metcalf, iar, recent, ca stimulatori ai megacariopoiezei, identificați a fi IL-3. Asemenea relații trofice există și în ganglionul limfatic, unde celulele macrofage din centrii germinativi, precum și din sinusoide, sunt celule nutritive și reglatoare ale proliferării și maturației limfocitelor prin intermediul monokinelor și limfokinelor. Cercetările realizate de către Osgood, mai ales după iradiere, au arătat că populația celulară stromală este radiorezistentă, ca și celulele stem pluripotente care, în strânsă legătură cu primele, condiționează regenerarea hematopoietică cu repopularea parenchimului. Inițial apar colonii hematopoietice care se transformă în plaje întinse, confluând între ele. Linia de reproducere sanguină începe de la o celulă blastică specifică acestei serii: proeritroblast, mieloblast, megacarioblast, limfoblast. Prin proliferarea mitotică, concomitent cu maturația prin mai multe diviziuni și etape de diferențiere, se ajunge la celulele mature din sângele periferic. Se cunosc acum constantele kinetice ale diviziunii pentru fiecare tip și vârstă celulară cu fazele ciclului mitotic: S, G_2, M, G_1 (fig. I.4). În proliferări active, raportul dintre celulele în mitoză și numărul total de celule, așa-numita fracție de proliferare, se apropie de 1, adică toate celulele se găsesc în mitoză; în condiții normale, fracția de proliferare în medie este în jur de 1‰. După mai multe cicluri celulare, unele celule-fiice intră în perioadă de repaus mitotic, în faza G_o, în afara ciclului. Se va vedea importanța acestor faze pentru aplicarea unei terapii citostatice de sincronizare în proliferările maligne.

Cifrele menționate cu privire la distrugerea și formarea echivalentă zilnică a celulelor sanguine arată cât de activă este dinamica ce asigură menținerea concentrației lor în sânge în limite constante și cât de mare este capacitatea neoformatoare a măduvei osoase. S-a calculat că, în cursul unei vieți de 70 de ani, ar fi egale cu de 6,6, respectiv de 700 de ori greutatea corpului.

Homeostazia concentrației de celule sanguine se menține permanentă în condiții fiziologice normale datorită faptului că producția de celule se desfășoară în limitele stricte ale așa-numitei „creșteri 0", conform căreia pentru fiecare celulă ce se pierde se formează una nouă (nici mai mult nici mai puțin); este ceea ce se mai numește *„steady state"*.

Introducerea tehnicilor cu radioizotopi, cu marcarea celulelor sanguine (radiofer și radiocrom pentru eritrocite, ^{32}P pentru granulocite, ^{35}S pentru trombocite și mai ales timidina marcată cu tritiu) a permis obținerea de date noi privind dinamica de neoformare a seriilor celulare sanguine și cunoașterea cineticii proliferării și maturării lor, precum și descoperirea unora din mecanismele de reglare a formării celulelor sanguine, de exemplu eritropoietina, care reglează pe cale umorală formarea eritrocitelor.

Hematopoieza este reglată printr-un sistem complex de interacțiuni mediate de un mare număr de factori solubili: eritropoietina, factorul stimulator de colonii de granulocite-macrofage (GM-CSF), factorul stimulator de colonii de granulocite (G-CSF), factorul stimulator de colonii de macrofage (M-GSF), interleukinele 1, 3, 5 și 6, factorul de

creștere insulin-*like* I, interferonul γ, factorul de necroză tumorală (TNF), precum și de celule reglatoare nehematopoietice, cu activități stimulatoare sau supresoare. Modul de acțiune în reglarea hematopoiezei a acestor factori este încă incomplet cunoscut.

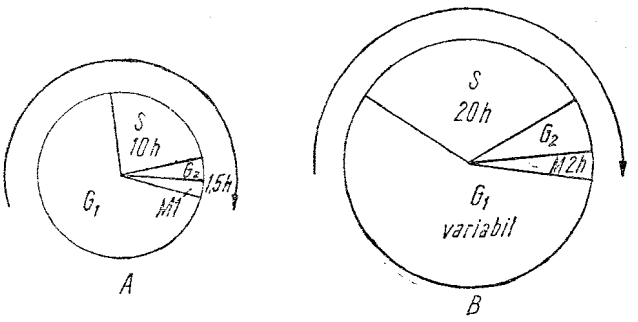


Fig. I.4. — Fazele ciclului celular: premitotică (S, G_2), mitotică (M) și postmitotică (G_1).

Fliedner a descris un „depozit", sau „compartiment funcțional", reprezentat de elementele celulare sanguine menținute într-o concentrație determinată și un „depozit", sau „compartiment de rezervă", situat în măduvă, din care se înlocuiesc celulele din sânge ce dispar prin îmbătrânire, migrare sau consum. Există unele indicii că raportul nemijlocit dintre cele două depozite este reglat umoral; astfel, una din piesele mecanismului de reglare este factorul de inhibiție a migrării leucocitelor.

Deosebit de important este depozitul celular, ce poate fi numit depozitul de proliferare și diferențiere, în care se desfășoară concomitent două procese: mărirea celulei, respectiv a nucleului (în cazul megacariocitului), și diferențierea, respectiv maturarea citoplasmei (hemoglobinizare în eritrocite, scăderea bazofiliei și creșterea neutrofiliei în granulocite). Durata în acest depozit de proliferare-diferențiere este de aproximativ 3—4 zile pentru eritropoieză, de 6 zile pentru granulopoieză și de 10 zile pentru megacariopoieză. Activitatea în acest depozit este coordonată de mecanisme de reglare încă puțin cunoscute; este posibil să participe factori de stimulare, cum sunt factorii de stimulare a coloniilor, și factori de inhibiție, care nu au fost încă bine precizați.

Diferențierea și **proliferarea** celulară sunt comandate genetic și au baze moleculare în relația ADN cromozomial—ARN nucleolar de transfer și ribozomal; comanda genetică prin ARN se înscrie la nivel de ribozomi pentru sinteza de proteine și enzime în toată diversitatea lor. Diversitatea genetică stocată în moleculele de ADN se exprimă în diversitatea proteinelor care determină structurile funcționale ale celulelor diferențiate. Un anumit echipament enzimatic comandat de genele proeritroblastului se leagă, pentru sintezele de globine, de hem și celelalte structuri ale eritroblastului. La fel, enzimele generate în mieloblast-promielocit în maturație vor comanda structura diferențiată a granulocitului adaptat la funcția de fagocitoză și bactericide. Hematopoieza cu diferențierea sa morfologică are, așadar, un substrat de diferențiere moleculară, cu comandă genetică descendentă ADN-ARN-pro-

teine enzime. Descoperirea „transcriptazei inverse" a dovedit că există şi o relaţie inversă, de la ARN către ADN, prin intermediul enzimelor polimerizante dependente de ARN, realizând sinteze specifice de ADN, care copiază ARN-matrice. În felul acesta, relaţia între structurile nucleotidice ale ADN (fig. I.5) pentru asamblarea în polipeptide a aminoacizilor apare şi în sens invers, pentru asamblarea adaptativă a nucleotidelor ADN pe comenzi specifice de diferenţiere.

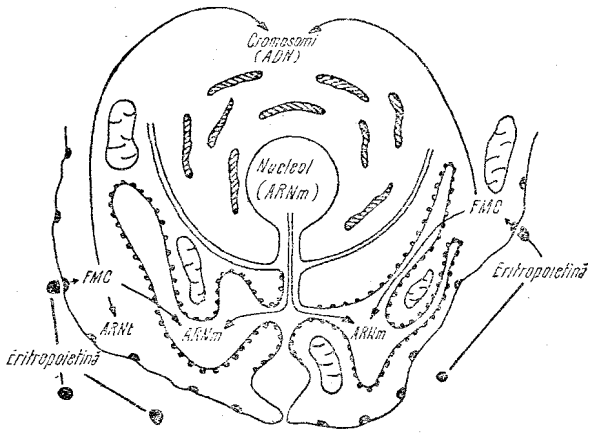


Fig. I.5. — Schema clasică a componentelor ultrastructurale cu circuitul informaţional care declanşează mitoza şi diferenţierea în eritroblast prin stimuli de eritropoietină pe receptorii la membrană.

În hematopoieză, funcţiile de proliferare mitotică şi de diferenţiere comandate genetic sunt declanşate şi facilitate de anumiţi factori stimulatori epigenetici, specifici pentru fiecare linie celulară. Se cunosc o serie de factori stimulatori de proliferare şi diferenţiere (5), şi anume: eritropoietina şi unii derivaţi steroizi, ca hormonii androgeni şi cortizonul, în special pentru eritropoieză. La aceştia se adaugă, cu acţiuni foarte bine definite ca factori de maturare, acidul folic şi vitamina B_{12}, a căror carenţă determină anemiile megaloblastice. Pe lângă aceşti factori stimulatori genetici şi epigenetici, există componente structurale metabolice, ca factori sau elemente de construcţie a celulelor hematopoietice. Aşa sunt Fe, Cu şi Co pentru sinteza hemoglobinei, alături de componentele proteinice cu aminoacizi specifici necesari structurilor şi funcţiilor celulare. Anumite anemii ca şi unele deficite imune sunt condiţionate de carenţe alimentare în condiţii sociale deosebite.

A treia funcţie a m.o. în completarea hematopoiezei este *citodiabaza*, care permite celulelor maturizate să pătrundă în circulaţia medulară şi să se descarce în sângele periferic. După cercetările lui Weiss mai ales, parenchimul medular este conţinut într-un mediu fibrilar şi geliform proteinaceu, în care celulele se dezvoltă şi din care se desprind pentru a pătrunde prin porii sinusoidelor în lumenul lor. Prin microscopie electronică s-au precizat anumite structuri proteinacee fibrilare

de-a lungul sinusoidelor. Celulele sunt dotate cu mobilitate, astfel că, prin mișcări ameboidale, mulându-se prin orificiul porilor, fac această traversare pe o întindere mare în patul sinusoidelor anastomozate. La fel și eritrocitele tinere, reticulocitele, păstrând încă reticulul de acizi ribonucleici și proteine, cu forma și volumul lor special, traversează sinusoidele medulare prin aceleași mișcări; de-a lungul vieții lor, de 100—120 de zile, ele vor traversa de mai multe ori, în cadrul circulației generale, porii sinusoidelor din splină și ficat.

În relația parenchim—stromă, structurile m.o. sunt un model funcțional de relație cu sângele periferic care, prin generare și descărcare continuă, face să se mențină constant, în limite fiziologice, numărul de leococite, trombocite și eritrocite. Necesitățile periferice de respirație tisulară, de reactivitate imună, precum și de homeostazie a coagulării declanșează factorii de stimulare și inhibiție echilibrată a hematopoiezei, constituind un model cibernetic în care proiectul genetic e potențial hematopoietic al celulelor stem se îndeplinește și este reglat prin relația dintre factorii de stimulare și cei inhibitori ai stimulatorilor, recunoscuți în condiții fiziologice de receptorii celulelor în proliferare și maturație. S-a formulat mai de mult noțiunea de „inhibiție de contact" ca funcție echilibrată de proliferare, care se oprește la o anumită densitate celulară (3). Unii autori au caracterizat mai târziu procesele leucemice și neoplazice, în general, prin pierderea acestei inhibiții de contact prin care celulele în proliferare nu mai recunosc semnalele de *feed-back* care să limiteze la un anumit prag viteza de proliferare (12). Funcționarea sistemului imun prin cooperarea macrofagelor cu limfocitele T și B constituie un alt model cibernetic, cu o autoreglare în care se recunosc și mai bine comenzile genetice și declanșatorii lor prin factori umorali, citokine, complexe imune, anticorpi antiidiotipuri etc.

În condițiile de răspuns hematopoietic crescut, ca în marile hemoragii sau în hemolizele accentuate, ca și în răspunsurile imune puternice cu granulopoieza crescută, rezerva hematopoietică se poate activa, zonele de măduvă grasă devenind zone de măduvă hematopoietică activă. Se știe în prezent că celulele grase sunt o componentă a sistemului reticuloendotelial (SRE) macrofagic, care nu se mai transformă în celule hematopoietice, cum s-a considerat inițial (2); activarea celulelor măduvei grase este posibilă datorită funcțiilor lor de celule stromale trofice, active nutritiv, și de stimulatori pentru focare de hematopoieză care se produc prin proliferarea celulelor stem migrate din sângele periferic. În capitolul „Hematopoieza", ca și în capitolele următoare, pentru fiecare serie hematopoietică se vor da detalii asupra mecanismelor de reglare prin factorii activi asupra celulei stem, cu capacitate de diferențiere specifică fiecărei linii celulare.

Referitor la disputa clasică dacă celulele hematopoietice, cu secvențele de diferențiere, provin dintr-o celulă hematopoietică pluripotentă unică sau din mai multe, în prezent, prin studiul hematopoiezei *in vitro*, ca și din observațiile citokinetice și citogenetice din alterările de diferențiere în leucemii, se poate conchide că disputa este depășită. A devenit evident că există o celulă stem pluripotentă pentru toate liniile celulare sanguine care apar în dezvoltarea embrionară. Teoria unicistă a lui Maximov apare confirmată și prin cercetările actuale. Prin observații

in vitro, Metcalf (13) și școala sa au arătat că există mai multe celule stem cu potențial hematopoietic distinct, și anume una pentru linia granulomonocitară și altele pentru liniile eritrocitare și megacariocitare, dar acestea pot deriva dintr-o celulă stem comună în parenchimul m.o. Este sigur însă că linia limfoidă este diferită în viața postembrionară, limfocitopoieza dezvoltându-se în formațiunile limfatice extramedulare, timus și ganglionii limfatici. Nu trebuie uitat însă că la embrion și celulele limfoide se dezvoltă inițial în m.o., după care migrează în timus și apoi, după ce s-au diferențiat liniile T și B, în ganglionii limfatici. Aceste interrelații embrionare pledează pentru o unitate generală a sistemului hematopoietic, care se dovedește și în patologia malignă, unde pot exista linii celulare bifenotipice și trifenotipice, cu caractere mixte de blaști -mielo-, mono-, eritro- și chiar megacarioblaști. Toate aceste observații constituie argumente pentru teoria unicistă. În condiții fiziologice normale, trebuie să recunoaștem liniile hematopoietice diferențiate cu celulă stem specifică, care este supusă factorilor reglatori, stimulatori și inhibitori specifici fiecăreia dintre ele. Morfologul citologist, ca și cercetătorul proceselor de diferențiere celulară normală și patologică trebuie să țină seama în caracteristicile fiecărei linii celulare, care se dezvoltă diferențiat, însă cu o capacitate latentă de a păstra anumiți markeri pentru o celulă comună.

BIBLIOGRAFIE

1. BARTL R., FRISCH B., BURKHARDT A.: Bone marrow biopsies. Edit. S. Karger, Basel, 1985.
2. BERCEANU ȘT., GOCIU M., GROZEA P.: Sistemul reticuloendotelial. Edit. Medicală, București, 1967.
3. BERCEANU ȘT., GOCIU M., RĂILEANU-MOȚOIU I.: Biologia celulelor sistemului limfo-reticulo-hematopoietic în culturi de țesuturi. Edit. Academiei R.S.R., București, 1969.
4. BERCEANU ȘT., GOCIU M.: În: A 3-a reuniune a Societății Internaționale de Hematologie, Divizia Afro-Europeană, Londra, 1975. Abstracts 4, 50: 5.
5. BERCEANU ȘT. (sub red.): Tratat de hematologie clinică. Edit. Medicală, București, 1977.
6. BRÜCHER H.: Knochenmark-zytologie. G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1966.
7. DEFENDY V., ROOBERT R. A.: The Thymus. Wistar Inst. Press, Philadelphia, 1964.
8. ERSLEV A. J., GABUZA T. G.: Pathophysiology of Blood. W. B. Saunders, Philadelphia, 1979.
9. GOCIU M., MOȚOIU I., BERCEANU ȘT.: În: A 3-a reuniune a Societății Internaționale de Hematologie, Divizia Afro-Europeană, Londra, 1975. Abstracts, 4, 50: 16.
10. GOOD R. A., FINSTAD J., GATTI R. A.: În S. Mudd (ed.): Infectious agents and host reactions. W. B. Saunders, New York, 1970, 129.
11. McCULLOCH E. A., TILL J. E.: Rad. Res. 1964; 22: 383. Sciences 1964; 144: 844.
12. METCALF D., MOORE M. A. S.: Haematopoietic cells. North Holland, Amsterdam, 1971, 242.
13. METCALF D.: Hemopoietic colonies. Springer Verlag, Berlin, 1977.
14. MOORE M. A. S., METCALF D.: Brit. J. Haematol. 1970; 18: 279. J. Nat. Cancer Inst. 1973; 50: 603.
15. NATHAN D. G.: New Engl. J. Med. 1989; 47: 328.
16. PAUL J.: În E. N. Willmer (ed.): Cells and tissues culture, Vol. I. Academic Press, Londra, New York, 1965, 239.
17. TILL J. E.: Fed. Proc. 1975; 34 : 2 279.
18. WEISS L.: Anat. Rev. 1986; 161 : 1 976.

II

HEMATOPOIEZA

G. GRIGORIU, TATIANA PUȘCARIU

ABREVIERI FOLOSITE ÎN TEXT

CSP = celula stem hematopoietică pluripotentă
CFC-S = celula formatoare de colonii în splină (sinonim cu CSP)
CFU-S = *colony forming units*-S (sinonim cu CSP și CFC-S)
CFC-GEMM = CFC mixte (granulocitare, eritroblastice, monocitare, megacariocitare)
CFC-Li B+T = CFC limfocitare B și T
CFC-E = CFC eritroide
CFC-EB = CFC-E *„burst"*, precursoare a CFC-E
CFC-GM = CFC granulomonocitare
CFC-G = CFC granulocitare
CFC-M = CFC monocitare
CFC-Meg = CFC megacariocitare
CFC-MegB = CFC-Meg *„burst"*
CFC-Eo = CFC eozinofile
CFC-Ba = CFC bazofile
E = eritrocit; Meg = megacariocit; Tr = trombocit; M = monocit; Mf = macrofag; Mbl = mieloblast; Ne = nesegmentat; Eo = eozinofil; Ba = bazofil; li = limfocit
LiNK = limfocit *„natural killer"*
FSCS = factorul stimulator al celulei stem
FSC-GM = factorul stimulator al coloniilor granulomonocitare
FSC-G = FSC granulocitare
FSC-M = FSC monocitare (sinonim: FSC-1)
FSC-EB = FSC eritroide *„burst"*
Epo = eritropoietina
FPE = factorul de potențare eritroidă
Tpo = trombopoietina
FSC-Meg = FSC megacariocitare
FCDP = factorul de creștere derivat din plachete
FSC-Eo = FSC eozinofile
FSC-Ba = FSC bazofile
IL — (1—13) = interleukine (1—13)
FIL = factorul inhibitor al leucemiei
FTC = factorii transformatori ai creșterii
FNT = factorul necrozant al tumorilor
FCF = factorul esențial de creștere a fibroblaștilor
SP = substanța P
LT = leucotriene
IFN = interferon
ICS = inhibitorul celulelor stem
PIM-1α = proteina inflamatorie a macrofagelor-1α (identică cu ICS)
FP = factorul plachetar
CsA = ciclosporina A
DSG = deoxispergualin

Celulele mature ale sângelui se află într-o continuă și intensă reînnoire. Producția zilnică a unui organism adult este de 200 miliarde de eritrocite, 100 miliarde de granulocite, trombocite și limfocite, 10 mi-

liarde de monocite. Acestea echivalează cu aproximativ 1 milion de celule din fiecare tip produse pe secundă sau, în doi ani, cu o cantitate de celule sanguine egală cu greutatea corpului. Dacă se ia în considerare faptul că în solicitări intense (sângerări, infecții) măduva hematopoietică își poate mări până la 5—6 ori producția celulară, se poate avea o imagine a enormului efort hematopoietic de care este capabil un organism.

Până nu demult, cunoștințele asupra regenerării celulelor sanguine erau obținute din studiul morfologic al celulelor diferențiate ale măduvei osoase și al celulelor din sânge; dezvoltarea tehnicilor de cultură *in vitro* și *in vivo* a dat posibilitatea observării directe a creșterii și dezvoltării celulelor hematopoietice nediferențiate. De asemenea, revoluționarea tehnicilor de biologie moleculară (îndeosebi genetică) s-a răsfrânt pozitiv și asupra acestui domeniu.

Hematopoieza este procesul prin care iau naștere celulele sanguine mature, funcționale. Acest proces complex, inițiat foarte timpuriu în viața embrionară, își schimbă de multe ori sediul, pentru a se cantona în ultima parte a vieții fetale în măduva osoasă, unde se va menține și de-a lungul întregii vieți adulte. Hematopoieza presupune existența a doi factori: celulele de origine care, printr-un lung șir de procese, se transformă în celule mature și micromediul hematopoietic, format din celule stromale și factori stimulatori (fig. 2.1).

CELULELE HEMATOPOIETICE

Celulele hematopoietice, situate la adult în măduva osoasă, se pot împărți în trei grupe mari (tabelul 2.I): (a) celulele stem pluripotente, (b) celulele progenitoare și precursoare, orientate către una sau mai multe

TABELUL 2.I

Celula	Caracteristici
Celulele stem hematopoietice	• Autoregenerare nelimitată • Diferențiere în precursorii multipotenți • Morfologie incertă • Detectate prin metoda coloniilor splenice la șoarece • Prezente în măduva osoasă și sânge
Celulele progenitoare hematopoietice	• Autoregenerare limitată • Diferențiere multi- sau unipotentă • Morfologie incertă • Detectate în culturi *in vitro* ca CFC-GEMM, CFC-GM, -E, -M, -Meg, -Eo, -Bazo etc. • Prezente în măduva osoasă și sânge
Celulele hematopoietice ale seriilor sanguine	• Autoregenerare absentă • Aspect morfologic distinct • Prezente în măduva osoasă

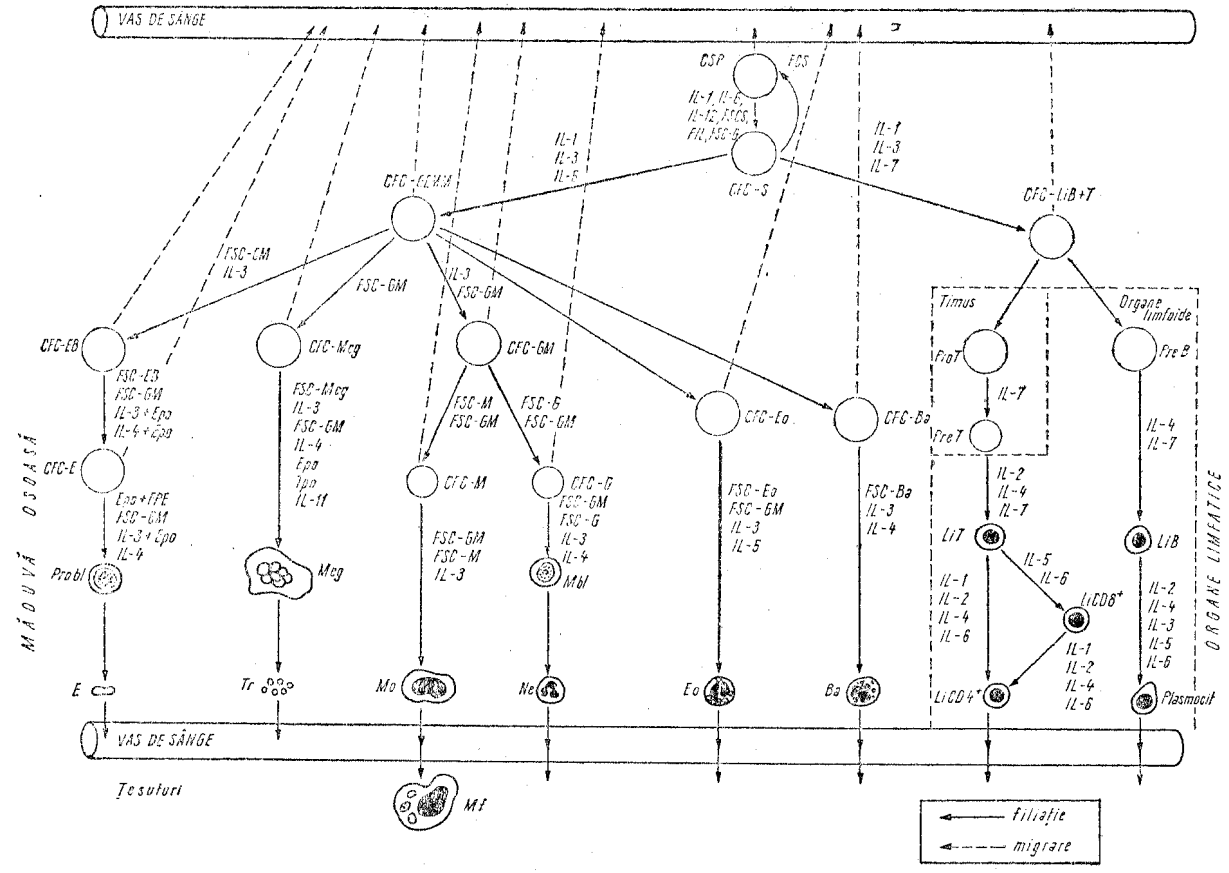


Fig. II.1. — Hematopoieza la adult.

linii sanguine şi c) celulele seriilor sanguine în diverse stadii de maturaţie. În acest capitol vor intra în discuţie numai celulele din primele două grupe, celelalte fiind prezentate în capitolele rezervate fiecărei serii celulare.

CELULELE STEM HEMATOPOIETICE PLURIPOTENTE (CSP)

Sinonime: celule formatoare de colonii în splină (CFC-S); *colony forming units* (CFU-S).

CSP sunt celulele de origine ale tuturor celulelor sanguine, derivate din celulele mezenchimale embrionare. Adevărata celulă stem a organismului este celula primordială rezultată din unirea celor doi gameţi în timpul concepţiei. Aceasta şi descendenţii săi se diferenţiază cu fiecare mitoză, fără să se conserve celule din stadiile anterioare. Când din mezenchim se diferenţiază celulele primordiale ale sângelui (CSP), ia naştere un ţesut cu caracteristici speciale. Capacitatea de diferenţiere a acestor celule este restrânsă doar la ţesutul sanguin, dar acest ţesut este într-o continuă şi rapidă reînnoire. În aceste condiţii este necesară menţinerea unei populaţii celulare capabile să participe la efortul regenerator prin diferenţierea continuă şi flexibilă a unora din celule, dar şi de menţinere a unui număr suficient de celule în stadiul nediferenţiat, ca rezervă. Altfel, epuizarea acestei populaţii celulare este fatală organismului adult, deoarece celulele mezenchimale embrionare s-au diferenţiat în totalitate.

Datele privitoare la celula stem pluripotentă provin din experimente pe şoareci. Iradiind şoarecii cu 10 Gy (doză letală) şi transplantându-le măduvă osoasă izogeneică având un marker cromosomial, s-a observat, la un interval de săptămâni sau luni după transplantare, că animalele iradiate supravieţuiesc şi au toate organele hematopoietice populate cu celule de tipul donatorului. Prin urmare, în măduva osoasă există celule capabile să restabilească hematopoieza.

Un progres considerabil pe această linie a fost realizat prin metoda coloniilor splenice, iniţiată de Till şi Mc Culloch (120). Injectarea de celule medulare singeneice (identice din punct de vedere genetic) la şoareci iradiaţi letal este urmată de apariţia în splină, după 10—14 zile, a unor noduli, vizibili macroscopic, constituiţi din celule precursoare eritrocitare, granulocitare, monocitare şi megacariocitare ca populaţii pure sau amestecate; lipsesc însă celulele limfocitare. S-a dovedit că fiecare nodul splenic reprezintă o colonie provenind dintr-o singură celulă stem, numită celula formatoare de colonii splenice (CFC-S). S-a dovedit astfel că aceasta este celula stem comună tuturor seriilor medulare. Ulterior, injectându-se la şoareci iradiaţi celule cu marker cromosomial provenite din colonii splenice, s-a constatat că toate organele hematopoietice, inclusiv cele limfoide, erau repopulate cu CFC-S marcate aflate în coloniile splenice, care nu s-au putut diferenţia limfoid în splina de şoarece (organ mieloid, situaţie particulară pentru şoarece) şi au păstrat intactă capacitatea de a deveni limfopoietice, într-un mediu corespunzător. În alte experimente, după injectarea unei suspensii de celule medulare, diluată astfel încât fiecare animal să primească o singură CFC-S marcată, s-a pus în evidenţă, după o perioadă de timp, prezenţa celulelor

marcate atât în măduva osoasă, cât și în organele limfoide centrale și periferice. Celulele limfoide conținând markerul celulei stem erau atât de tip B, cât și T. S-a dovedit astfel că CFC-S este celula stem pluripotentă.

Recent au fost dezvoltate metode de cultură *in vitro* pe termen lung, care ușurează creșterea și dezvoltarea de clone de celule hematopoietice multipotente (celule formatoare de colonii mixte, CFC-GEMM), organizate în colonii ce conțin toate liniile celulare mieloide (30). Este, de fapt, o celulă precursoare limitată la mielopoieză și are ca stimul specific interleukina 3 (IL-3), produsă de limfocitele T, fibroblaști și celule endoteliale din stroma medulară, sub influența IL-1 (78).

Dovezi despre existența celulei pluripotente provin și din analizele cromosomiale, enzimatice și imunologice ale celulelor din leucemia granulocitară cronică. Cromosomul Ph_1 este pus în evidență în toți precursorii mieloizi. În plus, transformarea blastică de tip limfoid (în 20—30% din cazuri) dovedește implicarea în procesul patologic inclusiv a seriei limfoide. Originea limfoidă a acestor celule este atestată, pe lângă aspectul morfologic, de prezența transferazei deoxinucleotidil-terminală, de markeri imunologici B de suprafață, de imunoglobuline sau lanțuri grele și ușoare în citoplasmă și de rearanjarea genelor Ig (20).

Celulele stem pluripotente nu pot fi recunoscute morfologic datorită numărului foarte mic și a morfologiei necaracteristice, deși asemănătoare limfocitului.

Celulele stem pot fi, totuși, identificate prin prezența pe suprafață a markerului *CD34*. Celulele medulare $CD34^+$ pot reconstitui toate liniile sistemului hematopoietic la animale iradiate letal, dovedindu-și pluripotența hematopoietică. Transplantarea la pacienți cu cancer generalizat tratați intens a celulelor medulare $CD34^+$ a dus la reconstituirea hematopoiezei. Antigenul CD34 a fost purificat până la omogenitate și a fost obținută o clonă de ADN complementar. Gena $CD34^+$ care controlează antigenul de membrană CD34 a fost localizată pe cromosomul 1q32 și constă în 8 exoni codificatori. Interesant este faptul că antigenul CD34 a fost pus în evidență și pe celulele endoteliale vasculare, dar nu pe endoteliile sinusoidale și din organele limfatice. De asemenea, a fost detectat pe suprafața fibroblaștilor. Nu sunt cunoscute pe baze experimentale funcțiile antigenelor CD34. Dispoziția transmembranară, cu extremitatea NH_2 mult în afara membranei, sugerează rolul de receptor. Activarea protein kinazei C și fosforilarea leucosialinelor pot fi puse în legătură cu procesele de adezivitate între celule stem și elemente stromale (29, 77).

Pe lângă markerul CD34 prezent atât pe CSP, cât și pe celulele progenitoare timpurii (CFC-GEMM), pentru identificarea celulelor din acest compartiment este util markerul CD38, pozitiv doar la celulele progenitoare și negativ la CSP. De asemenea, un marker ca RIB-19 devine pozitiv numai la celulele progenitoare tardive (CFC-G, CFC-M, CFC-Eo etc.).

Caracteristicile de bază ale CSP sunt: (a) autoregenerarea cu menținerea constantă a numărului lor. Cantitatea de CSP este foarte redusă față de enormul număr de celule mature pe care le pun în circulație. Densitatea CSP este de una la zece mii până la un milion de celule me-

dulare. Aceasta înseamnă că pool-ul de CSP al unui organism uman adult este de $1\text{-}2\times10^6$ celule; (b) diferențierea spre celule precursoare ale unei linii sanguine.

În sângele circulant al adultului se găsește un număr mic, dar constant, de celule stem pluripotente, care se află în echilibru dinamic cu rezervoarele extravasculare de celule stem. Când un teritoriu medular devine „aplastic", ca, de exemplu după o radioterapie intensă, celule stem din sânge migrează și repopulează teritoriul iradiat, dar numai cu condiția ca microclimatul medular care susține hematopoieza să nu fi fost inactivat de radioterapia efectuată (sub 4 000 R).

S-a estimat că la șoarece sunt suficiente 10—50 CSP pentru supraviețuirea animalelor iradiate letal. Aceste CSP pot proveni dintr-un sector al corpului protejat împotriva iradierii sau din celule medulare transplantate. La om, hematopoieza poate fi restaurată de câteva mii de CSP.

CELULE PROGENITOARE

Din CSP iau naștere celule cu o capacitate de diferențiere tot mai restrânsă. Acestea reprezintă grupul de celule progenitoare cu o capacitate limitată de autoregenerare. Pe o primă treaptă se exprimă numai diferențierea mieloidă (CFC-GEMM) și cea limfoidă (CFC-LiB+T). Pe a doua treaptă celulele mieloide își restrâng potența de diferențiere la două serii celulare (CFC-GM), apoi la una singură (CFC-G; CFC-M; CFC-Meg; CFC-E). La fel, celula limfoidă inițială se diferențiază în cele două serii limfoide (CFC-LiB, CFC-LiT), posibil și în linia celulară NK. Acestea sunt celulele unipotente, *precursoare* ale seriilor celulare sanguine, ce și-au încheiat ciclul de diferențiere și care se vor matura până vor ajunge celule funcționale.

Celulele progenitoare mieloide și limfoide: celula formatoare de colonii mixte (CFC-GEMM) și celula formatoare de colonii limfoide (CFC-LiB+T).

Reprezintă o populație celulară derivată din celula stem pluripotentă. Orientarea acestor celule este spre mielopoieză, în sensul că nu mai sunt capabile să se diferențieze în celule limfoide. Existența acestei populații celulare este dovedită prin formarea de colonii mieloide, *in vitro*, în culturi de lungă durată. Aceste colonii se dezvoltă în fază lichidă, pe suportul de celule stromale. Coloniile sunt mixte, adică eritroblastice, granulocitare, monocitare, megacariocitare.

În astfel de culturi s-a studiat defectul stromal din anemia aplastică a șoarecilor $S1/S1^d$, comparativ cu defectul celulelor stem din anemia aplastică a șoarecilor W/W^v. De asemenea, s-a putut studia rolul matricei extracelulare din măduva osoasă.

Cu o modificare de tehnică, în culturi celulare de lungă durată s-au putut obține colonii de limfocite B sau T. Acest tip de colonii este exclusiv limfoid, reprezentând echivalentul coloniilor mixte mieloide, adică având ca progenitor celula formatoare de colonii limfoide B și T.

Cele două tipuri de celule formatoare de colonii, unul mieloid (CFC-GEMM) și celălalt limfoid (CFC-LiB+T), exprimă prima orientare restrictivă a celulei stem pluripotente. Factorii stimulatori specifici ai

celor două tipuri de celule sunt FSC-GEMM, similar cu IL-3, și FSC-LiB+T. Asupra unor celule de o asemenea complexitate acționează și alți factori reglatori (23, 55, 62).

Celulele progenitoare eritroide: celula formatoare de colonii eritroide *„burst"* (CFC-EB) și celula formatoare de colonii eritroide (CFC-E).

Prin metoda coloniilor hematopoietice *in vitro,* în mediu semisolid de agar, metilceluloză sau cheag plasmatic, s-au pus în evidență două tipuri de precursori eritroizi. Cel mai precoce, derivând direct din CFC-GEMM, este celula formatoare de colonii eritroide *„burst"* (CFC-EB). Coloniile uriașe apar numai dacă în mediul de cultură se introduce factorul de stimulare al coloniilor eritroide *„burst"* (FSC-EB), iar după câteva zile, eritropoietină în cantități mari. Dimensiunile uriașe ale coloniilor apar ca urmare a diviziunilor din primele 3—7 zile de cultură, când acționează FSC-EB, cu migrarea în vecinătate a celulelor rezultate din diviziuni. Fiecare din celulele migrate dă naștere, prin stimularea eritropoietinei, unor mici colonii de celule care nu mai migrează. În 10—14 zile se acumulează un mare număr de celule ale acestor mici colonii, care prin suprapunere realizează colonia cu aspect de explozie, conținând până la 10 000 de celule eritroide.

Fiecare din celulele rezultate din diviziunile CFC-EB și care creează colonii de 50—200 de celule este un precursor eritroid mai evoluat, numit celula formatoare de colonii eritroide (CFC-E).

CFC-EB este o celulă blastică mare, cu numeroși nucleoli, citoplasmă intens albastră și cu o zonă perinucleară clară. Această celulă posedă antigeni de suprafață, ca HLA-A și B, HLA-DR, CD34. CFC-EB este stimulată în diviziune și diferențiere de factorul specific FSC-EB, dar și de FSC-GM și IL-3.

CFC-E, rezultat al acestei diferențieri, răspunde la stimularea eritropoietinei, de unde și numele de „celulă sensibilă la eritropoietină". În urma acestei stimulări, CFC-E devine proeritroblast. Sinteza de hemoglobină este realizată diferențiat, în sensul că lanțurile de globină sunt produse sub influența IL-3, iar pentru sinteza hemului este indispensabilă eritropoietina (99).

Celulele progenitoare granulomonocitare (CFC-GM; CFC-G; CFC-M). În 1966, s-a reușit cultivarea *in vitro,* pe medii semisolide, a celulelor medulare de șoarece, iar în 1970 metoda a fost adaptată pentru celule umane (104). Esențială în acest tip de cultură este înglobarea celulelor într-un mediu semisolid (agar, metilceluloză, fibrină) și dispunerea acestuia într-un strat superficial, așezat deasupra unui alt strat, bazal, cu rol nutritiv (fig. II.2). Acest strat nutritiv conține leucocite, celule embrionare, mediul în care au crescut celulele embrionare sau limfocite stimulate cu mitogeni, ser de la pacienți leucemici etc. Coloniile de celule granulomonocitare, care se dezvoltă în stratul superior al culturii, sunt formate în cea mai mare parte din celule ale seriilor granulocitară — de la mieloblast la granulocitul neutrofil matur — și monocitară, precum și dintr-un număr limitat de celule nediferențiate, celule progenitoare (fig. II.3). O colonie provine dintr-o celulă progenitoare granulomonocitară (celula formatoare de colonii granulomonocitare, CFC-GM). Numărul de colonii dintr-o cultură dă o imagine a cantității de celule

precursoare din măduvă. Numărul de CFC-GM din măduva normală este de 50—200$\times 10^5$ celule nucleate medulare. Coloniile de CFC-GM sunt inițiate și întreținute de un *factor stimulator al coloniilor granulomonocitare* (FSC-GM).

CFC-GM este o populație celulară cu un ritm rapid de proliferare, în contrast cu CFC-S, care sunt celule în majoritate în repaus cinetic. Originea unicelulară a coloniilor granulomonocitare a fost demonstrată în experimente de transfer al unei singure celule. Cu toate acestea, o

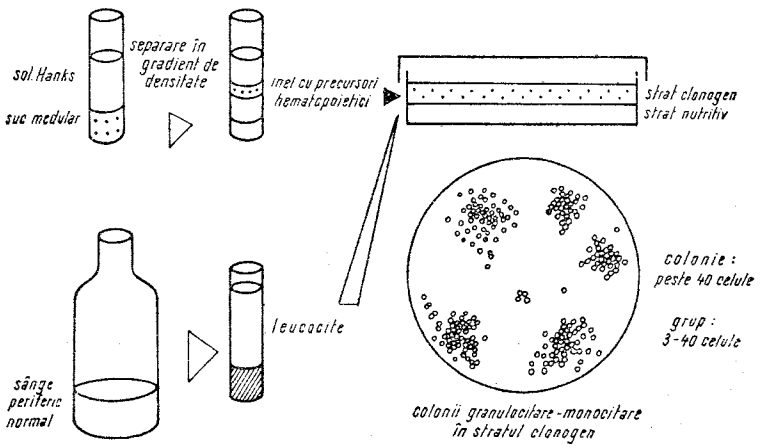


Fig. II.2. — Cultivarea în mediu semisolid de agar a celulelor măduvei osoase.

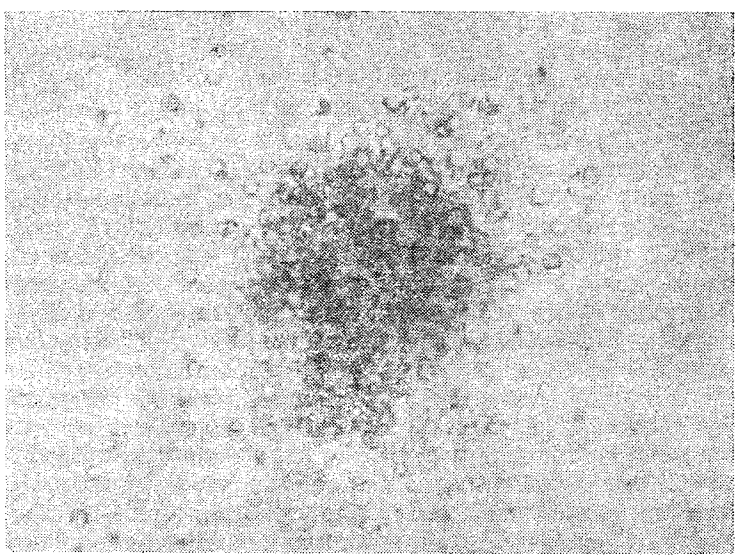


Fig. II.3. — Colonie granulomonocitară din stratul clonogen, la 9 zile de cultură.

colonie poate descinde din mai mult de o CFC-GM, ceea ce nu infirmă originea clonală a coloniei.

Sub acțiunea factorului stimulator al coloniilor granulomonocitare (FSC-GM) și a IL-3, CFC-GM se orientează spre celule formatoare de colonii granulocitare (CFC-G) sau monocitare (CFC-M), din care iau naștere mieloblastul și monoblastul.

Celulele progenitoare megacariocitare: celula formatoare de colonii megacariocitare *„burst"* (CFC-MegB) și celula formatoare de colonii megacariocitare (CFC-Meg).

Metodele de cultură *in vitro* a precursorilor hematopoietici au pus în evidență precursorul prin care din CFC-GEMM ia naștere prima celulă orientată megacariocitar, care este celula formatoare de colonii megacariocitare *„burst"* (CFC-MegB) (68). Asemenea CFC-EB, corespondentul său megacariocitar este o celulă dotată cu mobilitate în cultura *in vitro*, producând colonii de tip *„burst"*, „în explozie". După 3—4 diviziuni, CFC-Meg pierde proprietatea de a fi mobilă. Aceasta se divide de 3—5 ori dând naștere megacariocitelor. În acest fel, fiecare CFC-MegB poate produce 128 de megacariocite și CFC-Meg generează 16—32 de megacariocite.

Precursorii megacariocitari normali sau din bolile mieloproliferative pot fi identificați prin prezența unui marker specific, antigenul legat de factorul VIII intracitoplasmatic. Aceste celule, greu identificabile morfologic, dar asemănătoare limfocitelor, cu un diametru mai mic de 15 μm, au un nucleu rotund ușor dințat și sunt observate în culturile de megacariocite, începând cu ziua a cincia (74).

Pentru dezvoltarea CFC-MegB și CFC-Meg este necesară prezența în culturi a FSC-MegB și FSC-Meg, izolați din plasma pacienților cu anemie aplastică (71). Dar numai contactul cu acești factori stimulatori nu este suficient pentru creșterea numărului de megacariocite în culturi. În acest scop, pe lângă factorii specifici proliferării precursorilor megacariocitari, megacariopoieza are nevoie de alți stimulatori, ca IL-3, CFC-GM, CFC-G, care favorizează diferențierea, creșterea și maturarea megacariocitelor. IL-4 și eritropoietina pot acționa sinergic cu factorii menționați pentru diferențierea și proliferarea CFC-Meg (10). Partea finală a procesului de trombocitoformare este controlată de trombopoietină, factor identificabil în plasma și urina pacienților trombocitopenici (83).

Celulele progenitoare eozinofile: celula formatoare de colonii eozinofile (CFC-Eo). În culturi celulare pe medii semisolide s-a obținut dovada existenței celulelor progenitoare specifice eozinofilelor. Coloniile de eozinofile, inițiate de celulele formatoare de colonii eozinofile, cresc numai în prezența factorului de creștere al eozinofilelor, FSC-Eo, produs de limfocitele T, identic cu interleukina 5 (IL-5). Cu toate acestea, stimularea eozinofilopoiezei este mai complexă, în faza timpurie intervenind IL-1 și IL-3, iar în faza tardivă FSC-GM și FSC-G.

Celulele progenitoare bazofile: celula formatoare de colonii bazofile (CFC-Ba). Pentru a se obține colonii de bazofile, este necesar ca la culturile *in vitro* să se adauge factorul stimulator al bazofilelor FSC-Ba, și IL-3. Recent a fost descrisă și o celulă precursoare mastocitară

identificată prin dezvoltarea de colonii specifice *in vitro*. De altfel, au fost, semnalați precursori mastocitari în măduva osoasă, care au ajuns vehiculați de sânge în țesuturi, unde și-au continuat procesul de maturare.

Celulele progenitoare limfopoietice: celula progenitoare limfocitară B și T; celula pro-T; celula pre-T. Limfocitele din sânge provin din maturarea acestora în timus sau în alte țesuturi limfatice. Este însă bine stabilit că celulele care se dezvoltă în organele limfatice provin din măduva osoasă. Celula stem pluripotentă se orientează în două direcții, una reprezentată de celula progenitoare mieloidă (CFC-GEMM) și alta de celula progenitoare limfoidă (CFC-LiT+B). Modalitățile de diferențiere a celulelor limfocitare T, B și NK (*„natural killer"*) sunt complet diferite.

Celulele progenitoare ale limfocitelor T sunt celule proto-T, celule pre-T și unele etape intermediare până la limfocitul T matur. Celulele proto-T migrează din măduva osoasă și pătrund în cortexul subcapsular al timusului. Imediat are loc activarea genelor, urmată de modificări ale glicoproteinelor de pe suprafața celulară, care determină fenotipul celular T. În cursul procesului de diferențiere a limfocitelor T se dezvoltă markerii de suprafață, identificați cu ajutorul anticorpilor monoclonali. Restricția determinată genetic a funcțiilor limfocitului timus-dependent este efectuată în acest organ, ca și eliminarea clonelor care reacționează cu autoantigenul endogen. Timocitele autoreactive sunt înlăturate prin interacțiunea cu complexul major de histocompatibilitate (CMH) propriu, exprimat pe celulele epiteliale ale cortexului timic. De fapt, toate timocitele recunosc CMH propriu, dar cu o afinitate variată. Cele cu afinitate înaltă pentru CMH propriu sunt distruse în timus în cursul ontogeniei, pe când cele cu afinitate joasă sunt eliberate în periferie. Un număr mare de timocite mor în acest proces.

Diferențierea celulelor limfocitare B se face în două etape. Prima este independentă de antigen și reprezintă diferențierea celulelor CFC-LiB+T în *celula pre-B* și apoi în limfocite B. Apariția imunoglobulinelor citoplasmatice urmată de exprimarea acestora pe suprafața celulelor B în curs de diferențiere poate fi folosită pentru a urmări maturarea celulelor B. Maturarea în măduvă a celulelor B independente de antigen necesită mai multe diviziuni, în timpul cărora celulele dobândesc markerii de membrană timpurii — lanțurile μ — și mai târziu lanțurile ușoare.

Dezvoltarea ontogenică a limfocitelor T și B este redată în detaliu la capitolul Seria limfoplasmocitară.

Limfocitele NK nu au antigene de suprafață. Originea lor nu este clar stabilită, dar ele pot constitui o fracțiune imatură a limfocitelor T sau pot descinde direct din progenitorul limfocitar comun — CFC-LiT+B.

MICROMEDIUL HEMATOPOIETIC

Celulele stem hematopoietice, ca și progenitorii sau precursorii celulelor sanguine descendente din acestea au nevoie de un mediu propice pentru dezvoltare. Acest mediu este reprezentat de măduva

osoasă, un țesut ce se dezvoltă în spațiile delimitate de septurile spongioasei oaselor. Populațiile de celule hematopoietice coexistă acolo cu celule libere, fără constrângerea structurilor fixe ale altor organe. Cu toate acestea, celulele hematopoietice nu sunt dispuse la întâmplare. Diversele aglomerări celulare sunt rezultatul condițiilor de mediu care realizează „nișele ecologice" proprii dezvoltării fiecărei linii celulare.

Importanța micromediului hematopoietic este evidentă din viața intrauterină. Când în luna a cincea fetală se dezvoltă cavitățile osoase, timp de două săptămâni spațiile medulare sunt populate doar de elemente matriceale, stromale, fără parenchim hematopoietic extrasinusoidal. După constituirea stromei medulare, celulele hematopoietice migrate din ficat, îndeosebi celule stem, traversează pereții vaselor sinusoidale și dau naștere parenchimului medular format din colonii de celule hematopoietice. În perioada de constituire a hematopoiezei medulare fetale, în sânge circulă aproximativ 65 000 CFC-GM/ml sânge. Numărul acestora se menține relativ ridicat în cursul întregii vieți intrauterine și scade la 1—300 CFC-GM/ml sânge la adult (49).

Micromediul hematopoietic este compus din: (a) un complex de celule stromale mezenchimale; (b) o rețea matriceală extracelulară fibrilară de glicoproteine, de care se prind celulele hematopoietice și (c) factori de creștere produși de celulele stromale.

Celulele stromale ale micromediului hematopoietic sunt reprezentate de trei tipuri majore:

1) *Macrofagul,* dotat cu receptori specifici și a cărui creștere este stimulată de FSC-M. Macrofagele au un rol de eliminare a resturilor celulare rezultate în cursul hematopoiezei (nuclei expulzați din eritroblaști, celule ineficiente neviabile). Totodată, participă substanțial la hematopoieză prin factori stimulatori ai coloniilor, interleukine, leucotriene, prostaglandine, adică factori stimulatori și factori semnalizatori.

Celulele reticulare sunt monocite sinusale specializate, constituind stratul extern, adventiceal, al sinusurilor medulare. Aceste monocite plate, mari, cu prelungiri arborizate, anastomozate, formează o rețea *întinsă, polimorfă.*

2) *Celula endotelială,* care constituie stratul luminal al peretelui sinusurilor medulare. Celulele endoteliale sunt conectate între ele, dar pasajul celulelor mature spre lumenul sinusal nu se face la zonele de legătură dintre celule, ci transmural, prin zonele mai periferice. Traversarea celulei endoteliale se poate face numai prin intermediul receptorilor de pe fața dinspre membrana bazală, care selectează celulele sanguine cu un grad suficient de maturitate. Celulele endoteliale se dezvoltă prin stimularea cu FSC-GM, IL-1 și factorul necrozant al tumorilor (FNT) și sunt pozitive pentru antigenul factorului von Willebrandt.

3) *Fibroblaștii,* celule cu caractere contractile, fuzionând între ele într-un complex sincițial. Acestea conțin miozină, fibre de alfa-actină și sintetizează colagen I, III și IV. Factorul bazic de creștere a fibroblaștilor este secretat de celulele stromale și depozitat pe matricea fibrilară extracelulară și pe suprafața celulelor endoteliale (19). Prin metoda anticorpilor monoclonali s-a pus în evidență prezența în culturile de măduvă osoasă a unor precursori ai fibroblaștilor (114).

Pe lângă aceste trei tipuri celulare, un rol important au celulele adipoase din măduva osoasă, reprezentând rezerva energetică a țesutului hematopoietic. Totodată, celulele adipoase au rolul de a ocupa spațiul nepopulat de celule hematopoietice. În caz de solicitare intensă, celulele adipoase își reduc numărul pentru a permite expansiunea celulelor hematopoietice. Preadipocitele susțin hematopoieza prin secreția de factor stimulator al celulelor stem (FSC-S), IL-6, factor inhibitor al leucemiei (FIL) și FSC-M.

Celulele stromale interdigitate formează o matrice spongioasă tridimensională, în care se dispun celulele hematopoietice. Din interacțiunile care se stabilesc între diversele componente ale micromediului hematopoietic iau naștere factorii de creștere hematopoietici, constituindu-se, de fapt, micromedii pentru eritropoieză, granulocitopoieză și celelalte compartimente. Astfel se creează „nișe ecologice" diferențiate.

Aceste colonii de celule sanguine ce se diferențiază, se divid și se maturează, nu sunt distribuite întâmplător în „măduva roșie" din zona centrală a scheletului adult. Insulele de eritroblaști se dezvoltă în imediata vecinătate a peretelui sinusal. Cele mai apropiate de adventiția sinusului venos sunt celulele mai mature ale coloniei. Celulele tinere sunt fixate pe structurile fibrilare, așa încât dezvoltarea coloniei se face spre peretele sinusal. Numai după ce eritroblastul oxifil își elimină nucleul, pierzând o treime din greutatea sa, reticulocitul se desprinde complet din legăturile adezive și traversează peretele sinusal. Macrofagele care acoperă colonia, cu prelungiri printre celule, sunt pregătite să fagociteze nucleii expulzați sau celulele incapabile de maturație. Limfocitele constituie grupe compacte care înconjoară arterele mici, înainte de terminarea acestora în sinusurile venoase. Precursorii granulocitari sunt situați profund în parenchimul medular din axul osului și nu migrează spre sinusuri decât atunci când se maturează până la metamielocit, dobândind capacitatea de a se strecura prin fisurile adventicei și ale membranei bazale, traversând, în cele din urmă, celulele endoteliale. Megacariocitele se atașează strâns de suprafețele adventițiale ale sinusurilor venoase, cresc în dimensiuni fără să se dividă, sporindu-și cantitatea de ADN prin reduplicare. Când citoplasma voluminoasă a acestor celule multilobate se demarcă în teritorii trombocitare, celula matură emite benzi de trombocite direct în sinusuri.

Sediul de preferință al celulelor stem pluripotente este periferia cavității osoase. Într-un femur de șoarece care a fost golit de măduva roșie printr-un jet puternic de lichid, 90% din celulele formatoare de colonii splenice rămân aderente la pereții cavității cilindrice a osului. Din această zonă, celulele stem care încep un proces de diferențiere se îndreaptă spre una din zonele amintite.

Eliberarea celulelor mature prin bariera sinusurilor medulare antrenează numeroase modificări de mărime celulară, deformabilitate și capacitate locomotorie. De o mare importanță este detașarea celulelor de structurile matriceale de care s-au fixat în momentul nidării în nișa ecologică.

Cuplarea celulelor progenitoare hematopoietice pe proteinele matriceale reprezintă un element esențial în captarea acestora de către micromediul hematopoietic. Atașarea este mediată de proteine adezive,

cele mai importante fiind colagenul I, III și IV, fibronectina, laminina, hemonectina și trombospondina. Fiecare din aceste molecule fibrilare posedă un situs de recunoaștere conținând tripeptidul arginină-glicină-acid aspartic. Situsurile sunt recunoscute de receptorii de pe membranele celulelor progenitoare hematopoietice, acestea fiind β1-integrine formate din lanțuri alfa. β1-integrinele se exprimă pe celulele medulare $CD34^+$. Legarea fibronectinei de celulele $CD34^+$ se face după activarea acestora de către protein kinaza C.

Există un sistem de reglare a expresiei receptorilor de pe celulele hematopoietice. La progenitorii granulocitari, exprimarea receptorilor α5 β1 pentru legarea de fibronectină este reglată de nivelul FSC-GM. La niveluri ridicate de FSC-GM, adeziunea receptorului este intensă și celulele sunt imobilizate. Scăderea nivelului FSC-GM slăbește forța de legare a celulelor aflate în proces înaintat de maturare, până când acestea devin libere, capabile de mișcare. Celulele progenitoare eritroide primitive (CFC-EB) aderă la rețeaua matriceală prin legături fibronectină-receptori α4 β1. Prin diferențierea și maturarea gradată, aceștia pierd afinitatea pentru fibronectină și celulele sunt puse în libertate.

Micromediul hematopoietic este diferit în organele hematopoietice secundare. Timusul, de exemplu, este un organ limfoepitelial, având un cortex format din limfocite, celule epiteliale și macrofage. Nidarea în timus a limfocitelor pre-T se face prin atragerea acestora în afara vaselor prin substanțe chemotactice (B2m) și dirijarea lor spre zona de celule epiteliale. În contact cu acestea începe diferențierea progenitorilor limfocitelor T și deplasarea acestora spre zona medulară. În cursul acestei migrări, celulele limfoide se maturează, fapt dovedit de antigenele de suprafață caracteristice exprimate pe parcurs.

În procedeul transplantării de măduvă osoasă alogenică, celulele stem transplantate au nevoie de un micromediu hematopoietic funcțional pentru a se dezvolta în spațiile medulare ale gazdei, unde se cantonează. Dacă celulele stromale, elemente ale micromediului, au fost lezate prin chimioterapie, iradiere, infecții virale sau reacția grefei contra gazdei, apare rejectarea grefei. Cum deocamdată celulele stromale nu pot fi transplantate și nici administrarea de factori de stimulare recombinanți nu poate înlocui stroma deteriorată, trebuie avută o grijă deosebită pentru ocrotirea stromei în cursul pregătirii pentru transplantul medular (122).

FACTORII REGLATORI AI HEMATOPOIEZEI

Funcționarea celulelor hematopoietice este controlată de factori reglatori, unii cu sens pozitiv, de creștere, alții cu rol inhibitor. Flexibilitatea funcțională a complexului celular hematopoietic este realizată de acești factori de o mare diversitate și de receptorii specifici lor de pe membrana celulelor țintă. Metodele de cultură *in vitro* au furnizat date experimentale cu privire la factorii stimulatori și inhibitori, iar mijloacele de caracterizare biochimică și de clonare au completat cunoștințele actuale despre acești factori și despre receptorii lor celulari.

Factorii reglatori sunt citokine. Acestea pot fi factori de creştere, ca factorii stimulatori ai coloniilor hematopoietice şi eritropoietina, precum şi limfokine, dintre care amintim de interleukine, interferoni, factorul necrozant al tumorilor şi factorul de transformare a creşterii. Toţi aceşti factori sunt produşi ca răspuns la stimularea celulelor sursă de către stimuli inductori. Citokinele implicate în reglarea hematopoiezei acţionează prin structura lor specifică, prin nivelul cantitativ existent la un moment dat în mediu, uneori prin cooperarea cu alţi factori.

Factorii reglatori acţionează prin legarea de receptorii specifici, prin intermediul cărora transmit aparatului genomic din nucleul celulei mesajele pe care le poartă. Reacţia alosterică ce ia naştere în receptorii de membrană activează proteina G situată la capătul intern al moleculei receptor, pe faţa citosolică a membranei celulare. Rolul transducţiei semnalizate prin guanozin-trifosfat-proteina legată de proteina G este de a iniţia cascada fosfoinozitolului, o înlănţuire de reacţii care se termină cu activarea reglatorului intracelular, protein-kinaza C. Aceasta activează genele care produc un ARN şi proteinele necesare iniţierii fazei S a ciclului celular, a diferenţierii celulare sau orice alt proces comandat de factorul reglator extern.

Numărul acestor factori reglatori este mare şi în continuă creştere. Nu toţi au putut fi complet caracterizaţi. În continuare, vor fi prezentaţi câtiva mai importanţi dintre aceştia, sintetic, fiind expuşi în tabelul 2.II.

Factorul stimulator al celulei stem (FSCS): sinonim: C-kit ligand, *steel factor*. Poate fi detectat în ser sau legat de membrană. Iniţial este sintetizat ca un polipeptid legat de membrană şi eliberat ulterior prin clivaj proteolitic, ca proteină solubilă. Factorul seric este un polipeptid alcătuit din 165 de aminoacizi intens N- şi O-glicolizaţi. Genele FSCS au fost clonate. Exonii genomici aflaţi pe cromosomul 5 corelează foarte strâns cu cei ai FSC-M. Receptorul tirozin kinazic este o structură codificată de protooncogena C-kit. Au fost descrise ADN_c al C-kit şi secvenţa aminoacizilor.

Acţiunea FSCS se exercită direct numai asupra celulei stem pluripotente, în cel mai primitiv stadiu al acesteia, care precedă CFC-S. În combinaţie cu FSC-GM şi IL-3 influenţează activitatea CFC-S şi a CFC-GEMM (5). Acţiunea FSCS se extinde şi asupra CFC-EB, primele celule diferenţiate eritroid, stimulate în exprimarea genelor restrictive pentru linia eritroidă. Aceste CFC-EB sunt de tip tardiv, cu $CD34^-$, în care sinteza de globină este iniţiată de IL-3 şi FSCS, în timp ce sinteza hemului necesită prezenţa eritropoietinei (99).

Factorul stimulator al coloniilor granulomonocitare (FSC-GM). Are greutate moleculară de 22 000 daltoni şi conţine 127 de aminoacizi. Gena care codifică producerea acestui polipeptid este localizată pe cromosomul 5 la om şi pe cromosomul 11 la şoarece.

Domeniul de acţiune al FSC-GM este foarte larg. Efectul de stimulare a creşterii clonale include CFC-GEMM, CFC-EB, CFC-Meg, CFC-GM şi CFC-Eo. Asupra CFC-G acţionează indirect, prin stimularea macrofagelor pentru a produce FSC-G. Pe lângă stimularea creşterii şi diferenţierii acestor progenitori, FSC-GM activează funcţional celulele fagocitante, adică neutrofilele, monocitele, şi eozinofilele ma-

Factorii de creştere hematopoietici şi interleukinele

Numele		Sursa	Indus de	Celule ţintă	Gena
0		1	2	3	4
FSCS	Factorul stimulator al celulelor stem C-kit ligandul Factorul de creştere a mastocitelor	?		Celule stem	5
Epo	Eritropoietină	Rinichi, ficat	Hipoxie	Progenitori eritroizi	7q 11—22
FSC-GM	Factorul stimulator al coloniilor granulomonocitare	Limfocite T Macrofage Celule endoteliale Fibroblaşti Mastocite	FNTα, IL-1 (α şi β), endotoxină, forbol esteri	Progenitori ai neutrofilelor, eozinofilelor, monocitelor	5q 23—31
				CFC-GEMM, CFC-EB	5q 31.1
FSC-G	Factorul stimulator al coloniilor granulocitare	Macrofage Celule endoteliale Fibroblaşti	IL-1 (α şi β) FNTα, endotoxină	Precursori neutrofili, celule stem	17q 11.2—12
FSC-M	Factorul stimulator al coloniilor monocitare	Macrofage Fibroblaşti Celule epiteliale Celule endoteliale Osteoblaşti	IL-3, IL-4, FNTα	Monocite	
IL-1α	Pirogenul endogen	Macrofage Cele mai multe celule	Endotoxină, IL-1, FSC-GM, IL-2, FNTα	Celule stromale	2q
IL-1β	Factorul activator al limfocitelor	Celule endoteliale	Aceiaşi	Limfocite T Fibroblaşti Celule endoteliale	2q
IL-2	Factorul de creştere a limfocitelor T	Limfocite T	Mitogene, antigene, forbol esteri, lectine, IL-1	Limfocite T Limfocite B Macrofage Celule NK	4q

(Continuarea tabelului 2.II)

0		1	2	3	4
IL-3	FSC-GEMM Factorul de creştere a mastocitelor	Limfocite T Mastocite	Mitogene, forbol esteri, activarea receptorului IgE	CFC-GEMM CFC-EB CFC-S Macrofage	5q 23—31
IL-4	Factorul I de stimulare a limfocitelor B	Limfocite T (CD4+, CD8+)	Forbol esteri, ionofor calcic	Limfocite B Limfocite T Fibroblaşti Monocite	5q 31
IL-5	Factorul II de creştere a limfocitelor B Factorul de diferenţiere a eozinofilelor	Limfocite T	Antigene, mitogene, forbol esteri	Limfocite B Limfocite T Eozinofile	5q 23.1— —31—1
IL-6	Interferonul β_2 Factorul de creştere a hibridoamelor Factorul II de stimulare a limfocitelor	Macrofage Celule endoteliale Fibroblaşti Limfocite T Osteoblaşti	IL-1, mitogene, endotoxină	CFC-GEMM Limfocite T Limfocite B Megacariocite	7p
IL-7	Factorul stimulator al coloniilor de celule pre-B şi pre-T	Celule stromale	?	Limfocite pre B şi pre T Megacariocite	?
IL-8	Peptidul-1 activator al neutrofilelor	Monocite Neutrofile	FSC-GM IL-3	Neutrofile	
IL-9	Factorul de creştere a limfocitelor T	Limfocite T CD4+	Mitogeni	Limfocite T CFC-EB	
IL-10				Limfocite B	
IL-11		Fibroblaşti		Limfocite B	
IL-12				Limfocite NK	
IL-13		Limfocite T		CSP (interacţiune sinergică cu FSCS) Monocite-macrofage Limfocite B	5q 31

(Continuarea tabelului 2.II)

0	1	2	3	4
FNTα	Factorul necrozant al tumorilor Caşectina	Macrofage Limfocite B Celule NK	Endotoxină FSC-GM, IL-3 Forbol esteri	Celule endoteliale Fibroblaşti Limfocite T Celule progenitoare	6p
FIL	Factorul inhibitor al leucemiei Oncostatina M	Mononucleare din sânge Limfocite T activate Monocite	? Mitogeni	CFC-S Celule stromale	22q

ture, prin inhibarea migrării, stimularea fagocitozei şi creşterea producţiei de superoxid ca răspuns la chemoatractanţii bacterieni.

Factorul stimulator al coloniilor granulocitare (FSC-G). Are greutate moleculară de 25 000 de daltoni. Gena aflată pe cromosomul 17 codifică un polipeptid cu 30 de aminoacizi, secvenţă semnalizatoare, urmată de o secvenţă de 177 de aminoacizi ai FSC-G propriu-zis.

FSC-G stimulează preponderent formarea de colonii granulocitare şi este activ, de asemenea, asupra celulelor granulocitare mature, stimulând procesele legate de fagocitoză, citotoxicitatea dependentă de anticorpi, eliberarea de acid arahidonic. În plus, stimulează celulele stem pluripotente în repaus, pentru a intra în fazele G_1-S ale ciclului celular. Sinergia cu IL-3 stimulează formarea de colonii megacariocitare.

Factorul stimulator al coloniilor monocitare (FSC-M): sinonim: FSC-1. Este un dimer cu greutate moleculară de 28 000 de daltoni, constând în două lanţuri de peptide, fiecare cu greutatea de 14 000 de daltoni. Gena FSC-M aflată pe cromosomul 5 codifică mai multe transcripte ARNm. Receptorul FSC-M este produsul protooncogenei c-fms şi este o tirozinkinază care autofosforilează.

FSC-M acţionează atât asupra CFC-M, cât şi asupra macrofagelor, stimulând sinteza de proteine, diviziunea celulară, activitatea antitumorală, secreţia activatorului plasminogenului. De asemenea, induce producerea de IL-1 de către macrofage. Acţionează sinergic cu IL-3 şi IL-1 pentru formarea de colonii de macrofage *in vitro*.

Toţi factorii stimulatori ai coloniilor sunt eliberaţi de celule activate (limfocite T, celule endoteliale etc.). Numai producerea FSC-G şi FSC-M nu are nevoie de activare. În mod normal, ei se găsesc în cantitate redusă, dar suficientă pentru nevoile curente. În caz de agresiune intervin activatorii (endotoxina, IL-1, FNT) producând creşterea marcată a tuturor factorilor stimulatori.

Eritropoietina (Epo). A fost purificată până la omogenitate din urina pacienţilor cu anemie aplastică. Este o glicoproteină cu greutate moleculară de 34 000 de daltoni. Gena Epo umană se află pe cromosomul 7 (q11—q22). Cel puţin 5 exoni codifică ARNm.

Epo este un hormon sintetizat de celulele endoteliale ale vaselor peritubulare renale. Celulele endoteliale sunt sensibilizate de un „sen-

sor de oxigen" cu proprietăți de proteină heminică. Acesta este capabil să perceapă hipoxia tisulară, inducând în celulele endoteliale exprimarea genei care controlează producerea eritropoietinei (55). După stresul hipoxic, nivelul ARNm din rinichi crește datorită unei transcripții mărite de gena Epo (76). Hipoxia, de orice cauză, duce deci la creșterea producției de Epo (fig. II.4). Pe lângă rinichi, o cantitate mai mică de Epo este produsă în ficat, organul care în viața fetală produce toată cantitatea de Epo.

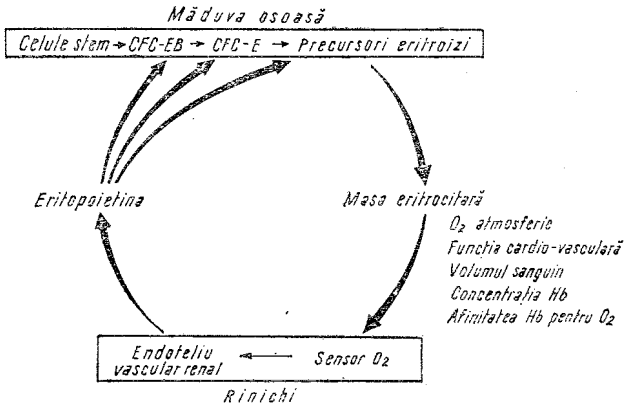


Fig. II.4. — Circuitul feedback al producerii eritropoietinei (după Jandl J. H.: Blood Physiopathology, Blackwell, 1991).

Epo se atașează de receptorii de pe suprafața CFC-E și CFC-EB, în cursul fazei G_1 a ciclului celular, stimulând diviziunea și maturarea acestora. Progenitorii eritroizi au niveluri diferite ale sensibilității la Epo. CFC-EB răspund la stimularea numai cu doze mari de Epo, situație în care o fracțiune a CFC-EB răspunde și la stimularea cu un factor secretat de macrofage, FSC-EB. În condiții de solicitări normale, cantitatea de Epo secretată este de nivel redus, acționând asupra CFC-E. Populația de CFC-E reprezintă sediul de predilecție a acțiunii Epo, din care cauză CFC-E se mai numesc celule sensibile la Epo. Totodată, Epo participă la acțiuni sinergice cu alți factori stimulatori ai progenitorilor hematopoietici (CFC-GEMM, CFC-Mk), dar și asupra celulelor în curs de maturare din seria eritroidă.

Trombopoietina (Tpo). A fost identificată în serul pacienților cu trombocitopenie, întocmai ca eritropoietina la anemici. Gena care codifică Tpo nu a fost caracterizată încă prin clonare. Tpo este similară ca acțiune biologică cu o proteină izolată din celule renale embrionice. Ambele au influență asupra trombocitopoiezei *in vivo*, dar și asupra precursorilor megacariocitari primitivi, *in vitro*.

Interleukina 1 (IL-1α și IL-1β). Există două forme ale moleculei IL-1 (α și β), ambele izolate și clonate, codificate de 2 gene de pe cromosomul 2. Receptorul IL-1 fixează ambele forme ale IL-1. Este produsă de macrofage și de alte celule.

Activitatea biologică a IL-1 este foarte largă. Pe lângă efectul asupra precursorilor hematopoietici, IL-1 reglează cele mai multe procese ale inflamației. Reglarea hematopoiezei are loc în mod indirect, pe mai multe căi: (a) acționează asupra celulelor stem în repaus pentru inducerea expresiei receptorilor factorilor stimulatori (34); (b) induce producerea și eliberarea factorilor stimulatori ai coloniilor de către fibroblaști, celule endoteliale și celule stromale; (c) favorizează proliferarea progenitorilor hematopoietici sinergic cu FSC-GM, FSC-G, FSC-M și IL-3; (d) stimulează proliferarea de limfocite B și T.

În inflamație participă îndeosebi IL-1α, numită și pirogenul endogen, în combinație cu FNT și IL-6. Creșterea temperaturii, stimularea producerii proteinelor de fază acută (proteina C reactivă, amiloidul seric A), activarea celulelor endoteliale cu creșterea adezivității neutrofilelor și a efectului procoagulant al acestora, eliberarea de prostaglandine, stimularea producerii de citokine de către macrofage și limfocitele T, inducerea somnului, activarea osteoclastelor sunt câteva din acțiunile IL-1.

Un efect stimulator exercită IL-1 asupra celulelor formatoare de colonii de celule leucemice (CFC-LAM). Efectul este indirect, prin stimularea eliberării FNT-α de către LAM care, la rândul său, crește producția de IL-3 și FSC (28).

Interleukina 2 (IL-2). Produsă de limfocitele T este cunoscută și sub numele de factorul de creștere a limfocitelor T, deoarece acestea sunt sursa principală și ținta principală a IL-2.

În plus, activitatea IL-2 se extinde și asupra limfocitelor B și a celulelor NK, prin stimularea proliferării și a activității funcționale. De asemenea, IL-2 induce expresia IL-1 în monocite și macrofage și are o activitate imunomodulatoare citotoxică.

Receptorul IL-2 este exprimat pe limfocitele T, limfocitele B și celulele NK. Deși receptorii IL-2 sunt similari, răspunsurile biologice sunt diferite, datorită programelor diferite ale genelor acestor celule. În consecință, IL-2 induce expresia genelor care controlează producerea de imunoglobuline de către limfocitele B și diviziunea celulară la limfocitele T.

Producerea în cantități insuficiente a IL-2 este asociată cu boli care deprimă funcția limfocitelor T, incluzând cancerele metastatice avansate, sindromul de imunodeficiență dobândită (SIDA) și unele sindroame de imunodeficiență primară. Detectarea IL-2 împreună cu limfocitele T activate în lichidul sinovial al pacienților cu artrită reumatoidă activă sugerează un rol potențial al IL-2 în patogenia acestei boli.

Interleukina 3 (IL-3, FSC-GEMM). Produsă de limfocitele T, a fost caracterizată fizico-chimic, purificată și clonată genetic.

IL-3 își exercită acțiunea prin sistemul protein-kinazei C, ca și semnalizarea de la nivelul receptorului prin proteinele G pe calea mesager secundară a inozitol fosfatului. Gena IL-3 codifică o proteină de 14 000—28 000 de daltoni și se află situată pe brațul lung al cromosomului 5 la numai 9 kb de gena pentru FSC-GM. Numai limfocitele T și mastocitele exprimă gena IL-3. Deși IL-3 și FSC-GM posedă un intens potențial stimulator al coloniilor și sunt situate atât de aproape pe același cromosom, reglarea genelor lor este diferită. Celulele stro-

male produc doar FSC-GM. Limfocitele T produc atât IL-3, cât și FSC-GM, dar acestea sunt reglate independent.

Spectrul de acțiune al IL-3 este foarte larg. Acțiunea sinergică a IL-3 cu FSC-GM, Epo, FSCS are loc de la nivelul celulelor stem până la CFC-monoliniare, extinzându-se și asupra celulelor în curs de maturare. Efectul stimulator direct al IL-3 este limitat la CFC-S, CFC-GEMM și CFC-EB. Acțiunea asupra bazofilelor este evidentă *in vivo* prin administrarea de IL-3 la șoareci, dar pare să fie indirectă, prin celulele accesorii. IL-3 nu acționează asupra eritropoiezei, dar împreună cu FSC-GM potențează efectul eritropoietinei pentru formarea de colonii.

Interleukina 4 (IL-4). Este o glicoproteină cu greutate moleculară de 20 000 de daltoni, cu gena pe cromosomul 5 și este produsă de limfocitele T și de alte celule.

IL-4 induce proliferarea limfocitelor B activate, a limfocitelor T, mastocitelor și fibroblaștilor și activează macrofagele. De asemenea, produce exprimarea propriului receptor pe limfocitele B și T, induce schimbarea izotipică a IgG și IgE în limfocitele B activate, induce proliferarea fibroblaștilor, precum și secreția interferonului γ de către limfocitele T și induce diferențierea limfocitelor T citotoxice.

În culturi celulare s-a demonstrat că IL-4 inhibă expresia IL-1, IL-6, FNTα și FSC-G în monocite, precum și secreția acestor factori. IL-4 acționează prin reducerea activității transcripționale a genelor c-fos și c-jun (36). De asemenea, poate acționa ca reglator negativ al megacariocitopoiezei umane *in vitro*. Acțiunea are loc pe un stadiu timpuriu al megacariociptopoiezei (celule $CD34^+$, $HLA\text{-}DR^+$) și este o acțiune inhibitorie independentă de factorul de transformare a creșterii β (FTCβ), FNTα, IFNα și γ, inhibitori ai tuturor tipurilor de colonii *in vitro*. IL-4 are un efect supresor asupra acțiunii IL-2 de stimulare a proliferării limfocitelor T și B și de inducere a secreției IgM.

Interleukina 5 (IL-5). Este produsă de limfocitele T. Gena care codifică IL-5 este situată pe cromosomul 5q și este deleționată în sindromul $5q^-$ (116).

Acțiunea IL-5 se exercită în câteva direcții majore (a) asupra limfocitelor T, activându-le citotoxicitatea; (b) asupra limfocitelor B, prin inducerea secreției de imunoglobuline; (c) asupra eozinofilelor, ca factor de diferențiere similar cu FSC-Eo. În culturi celulare, IL-5 are efect de creștere a coloniilor. În schimb, activitatea funcțională a eozinofilului matur este mai bine susținută prin cooperarea IL-5 cu IL-3 și FSC-GM.

În studii *in vitro*, IL-5 s-a comportat și ca o bazofilopoietină, demonstrându-se stimularea secreției de histamină și de diferențiere bazofilă (26).

Interleukina 6 (IL-6). Produsă de limfocitele T, macrofage și alte celule, este o proteină cu greutate moleculară de 21 000—26 000 de daltoni, codificată de o genă situată pe brațul scurt al cromosomului 7. Gena este exprimată de celule diverse, ca limfocite T, monocite, celule endoteliale și fibroblaști.

Activitatea biologică a IL-6 este foarte largă. La nivelul progenitorilor hematopoietici, CFC-S favorizează proliferarea prin inducerea celulelor în faza S a ciclului. De asemenea, susține diferențierea granu-

locitară a celulelor progenitoare hematopoietice și intervine în megacariocitopoieză pe formele mature, prin creșterea ploidiei (21). Cele mai numeroase acțiuni le are în mod sinergic cu alte citokine. Astfel, funcționează sinergic cu IL-3 în stimularea CFC-GEMM, CFC-EB și CFC-Meg, cu FSC-G și IL-4 în creșterea coloniilor granulomonocitare, cu IL-4 în inducerea proliferării limfocitelor T, cu IL-2 în stimularea secreției de imunoglobuline.

IL-6 este un inductor puternic al sintezei proteinelor de fază acută. Producerea proteinei C reactive de către hepatocitele umane în cultură este controlată numai de IL-6. De importanță practică este faptul că IL-6 este produsă în cantități mari la pacienții cu mielom multiplu, direct proporțional cu masa de celule neoplazice. Proteina C reactivă, care reflectă producția integrală de IL-6 *in vivo,* este unul din cei mai fideli factori de prognostic în mielomul multiplu. Creșterea nivelului proteinei C reactive este un indiciu de boală progresivă și agresivă. FSC-GM, IL-3, IL-5 și FSC-G sunt sinergice cu IL-6 în susținerea proliferării celulelor mielomatoase (73). IFNα și FNT induc o producție autocrină a IL-6, în timp ce IFNγ inhibă proliferarea celulelor mielomatoase.

IL-6 este produsă în cantitate mare în osteoblaști și această producție este crescută prin stimularea cu IL-1 sau FNT. Resorbția osoasă indusă de IL-1 sau FNT prin creșterea numărului de osteoclaști este mediată de IL-6 (73).

Interleukina 7 (IL-7). Produsă de celulele stromale medulare și de celulele tinere marginale, este slab caracterizată fizicochimic și genetic.

Acțiunea principală este aceea de factor de creștere a coloniilor de celule pre-B și pre-T. În plus, stimulează megacariocitopoieza în combinație cu IL-3 și eritropoietina și stimulează proliferarea timocitelor.

Interleukina 8 (IL-8). Produsă de macrofage și numită și peptidul-1 activator al neutrofilelor, este un stimulator puternic al chemotaxiei neutrofilelor și mai puțin al limfocitelor T și un mediator major al răspunsului inflamator acut.

IL-8 induce neutrofilele să secrete molecula-1 de adeziune a lectinei, stimulează integrina β_2, care favorizează atașarea neutrofilelor de endoteliu, și este esențială pentru migrarea ulterioară prin peretele vasului sanguin. În plus, IL-8 susține „explozia respiratorie" și degranularea lizosomală. Este un factor chemotactic neutrofil major în plămân, unde este produsă de macrofagele alveolare și celulele alveolare de tip II, ca răspuns la stimularea cu IL-1 și FNTα.

Neutrofilele și monocitele produc IL-8 prin stimularea de către FSC-GM, dar nu și de FSC-G. IL-3 induce un efect similar asupra monocitelor. Pe baza acestor date, este preferabilă administrarea terapeutică a FSC-GM uman recombinat pentru creșterea răspunsului față de infecții.

Interleukina 9 (IL-9). Este produsă de limfocitele T *helper/inducer,* activate de mitogene și are acțiune preponderentă de stimulare a creșterii limfocitelor T. De asemenea, exercită un efect stimulator în formarea coloniilor eritroide de tip „*burst*" (CFC-EB), dar acțiunea este mai intensă asupra progenitorilor eritroizi fetali. Această acțiune este și mai intensă dacă este sinergică stimulării cu IL-3 și FSC-GM (37).

IL-9 poate acționa și ca factor chemotactic pentru neutrofile. Recent, pe baza unor date experimentale, s-a emis ipoteza că IL-9 poate avea un rol în patogenia bolii Hodgkin și a limfomului anaplastic cu celule mari (85).

Interleukina 10 (IL-10). Produsă de limfocitele T, este un factor de creștere și diferențiere a limfocitelor B, îndeosebi a celor activate de virusurile Epstein-Barr sau HIV. În serul persoanelor normale nu a fost detectat nici un nivel de IL-10, dar aceasta a fost găsită la 48% din pacienții cu limfoame active și la 6% din cei cu limfoame în remisiune. Împreună cu alte limfokine care controlează limfocitele B, ca IL-6, IL-1α și FNTβ, se admite implicarea IL-10 în patogenia limfoamelor B sau a leucemiei limfocitare cronice.

Se pare că IL-10 acționează ca un factor autocrin de creștere.

Interleukina 11 (IL-11). Este un polipeptid format din 199 de aminoacizi. Gena IL-11 a fost izolată din fibroblaști din plămânul fetal uman.

Activitățile IL-11 cunoscute până în prezent sunt: (a) stimularea proliferării limfocitelor B și a secreției de imunoglobuline; (b) acțiunea sinergică împreună cu IL-3 pentru stimularea proliferării progenitorilor hematopoietici prin scurtarea fazei G_o, după care celulele formatoare de colonii răspund mai eficient la stimularea altor factori de creștere. Intrarea în ciclul celular a celulelor progenitoare are loc după 3 ore de la administrarea IL-11 și IL-3, iar creșterea numărului absolut de progenitori se observă după 24 de ore; (c) aceeași asociere sinergică duce și la intensificarea formării de colonii megacariocitare. Efectul imediat, *in vitro*, este declanșarea diferențierii spre megacariopoieză a precursorului multiliniar — CFC-GEMM, urmat de stimularea ploidiei; (d) este susținută sinteza proteinelor de fază acută; (e) activarea unui factor inhibitor al adipogenezei prin care se reduce activitatea lipoprotein lipazei și diferențierea adipocitelor.

Interleukina 12 (IL-12). Descoperită recent, are funcție de factor stimulator al celulelor NK. S-a pus în evidență interacțiunea sinergică între IL-12 și FSCS pentru proliferarea progenitorilor primitivi — CSP (37b).

Interleukina 13 (IL-13), recent identificată (McKenzie și colab., 1993) este produsă de diferite subseturi de limfocite T activate de stimuli antigenici specifici sau policlonali. Gena IL-13 este situată pe cromosomul 5q 31, regiune care codează și alte gene pentru factori hematopoietici și factori de creștere imunoregulatori, cum sunt: IL-3, 4, 5 și FSC-GM.

Acțiunile IL-13 sunt cunoscute deocamdată mai mult din observații *in vitro*. Astfel, ea are o serie de efecte asupra monocitelor-macrofage, modificându-le morfologia, expresia de antigene de suprafață, citotoxicitatea și sinteza de citokine, efecte comparabile cu ale IL-4. IL-13 schimbă fenotipul monocitelor, le scade activitatea inflamatorie, inhibându-le producția de citokine proinflamatorii și le crește capacitatea de a prezenta antigenul. Limfocitelor B, IL-13, ca și IL-4, le modulează fenotipul de suprafață și le stimulează proliferarea și creșterea. Spre deosebire însă de IL-4, IL-13 nu activează limfocitele T

(125a). Ea induce de asemenea producția crescută de IgM și IgG, dar nu și de IgA și scade afinitatea receptorului pentru IgE.

Factorul necrozant al tumorilor α (FNTα, sau cașexina). Este o proteină cu greutate moleculară de 17 000 de daltoni, codificată de o genă localizată pe cromosomul 6, în vecinătatea complexului major de histocompatibilitate și este produs de macrofage, limfocite B și celule NK. În macrofagul nestimulat, FNTα se găsește ca precursor, din care se dezvoltă o mare cantitate de molecule mature la câteva minute după expunerea la un stimul puternic, cum este endotoxina.

FNT se prezintă sub două forme FNTα sau cașexina, produsă de limfocite T și macrofage și FNTβ sau limfotoxina, ambele având în general acțiuni similare. FNTβ activează limfocitele NK, limfocitele T citotoxice, celulele endoteliale și macrofagele.

FNTα are acțiune cu spectru larg. Ca și IL-1, acționează prin inducerea, în mod secundar, a exprimării altor gene care funcționează ca reglatori mai specifici ai răspunsului hematopoietic. Din activitățile sale numeroase se pot reține: (a) necroza hemoragică a tumorilor experimentale prin acțiune citotoxică; (b) șoc prin insuficiență vasculară acută, distrucții celulare, anomalii metabolice și modificări neuroendocrine (prin pătrunderea în circulație a FNTα); (c) ca și IL-1, induce sinteza FSC—GM, activează limfocitele B și T, are activitate antivirală prin distrugerea celulelor infectate, acționează ca pirogen endogen, induce sinteza de proteine de fază acută; (d) inhibă exprimarea genelor Epo, anemia din inflamațiile cronice fiind în bună parte efectul acțiunii FNTα; (e) stimulează, ca și IL-1, producerea de colagenază și prostaglandine E_2 de către celulele sinoviale și fibroblaștii dermici, stimulează resorbția osoasă și angiogeneza. La niveluri normale, aceste citokine mediază homeostazia tisulară prin reparare și remodelare, dar în cantități mari produc distrucții tisulare, de țesut conjunctiv, în boli inflamatorii imune.

Interferonul γ (IFN-γ). Este produs de limfocitele T și limfocitele NK și posedă mai multe acțiuni: activează limfocitele NK, limfocitele T citotoxice, celulele endoteliale și macrofagele, costimulează proliferarea limfocitelor B, inhibă proliferarea limfocitelor T și are și o activitate antitumorală.

Oncostatina M. Este o citokină produsă de limfocitele T activate și monocite. Face parte dintr-o clasă de citokine care mai include IL-6, FSC-G, FIL (factorul inhibitor al leucemiei) și factorul ciliar neurotrofic. Toate sunt implicate în sistemele de semnalizare intracelulară prin componenți comuni ai receptorilor.

Acționează asupra celulelor stromale medulare, inducând creșterea sintezei și secreției factorilor stimulatori ai hematopoiezei (19).

Factorul inhibitor al leucemiei (FIL). A fost identificat prin capacitatea de a induce diferențiere și simultan de a inhiba proliferarea unor celule leucemice murine. Omologul uman a fost localizat pe cromosomul 22. În combinație cu FSC-GM și FSC-G, acționează inhibitor asupra proliferării celulelor leucemice *in vitro*. De asemenea, suprimă tendința naturală la diferențiere a celulelor stem embrionare.

Deşi inhibitor al proliferării celulelor leucemice, FIL induce diferenţierea celulelor stem pluripotente, având similarităţi funcţionale cu IL-6, FSC-G, IL-11 şi IL-12.

Factorii transformatori ai creşterii (FTC). Constituie o familie heterogenă de polipeptide.

FTCα se află în competiţie cu factorul de creştere epidermal, pentru legarea de aceiaşi receptori. Ambii stimulează creşterea osteoclastelor.

FTCβ este un dimer, cu greutate moleculară de 25 000 de daltoni, care inhibă hematopoieza şi adipogeneza, forţând celulele imature să se diferenţieze.

$FTC\beta_1$ produce încetarea proliferării celulelor mezenchimale, determinându-le să producă fibronectină, colagen, proteoglicani şi alte molecule esenţiale fixării celulelor hematopoietice imature.

$FTC\beta_2$ inhibă răspunsul proliferativ al limfocitelor T la stimularea IL-2.

Alţi factori stimulatori ai hematopoiezei.

Factorul esenţial de creştere a fibroblaştilor (FCF) este o citokină, factor de creştere multifuncţional, mitogen pentru celulele stromale medulare. Acţiunea de stimulare a celulelor progenitoare granulomonocitare este indirectă, prin anihilarea efectului inhibitor al factorului transformator al creşterii — B_1. Este stocat intracelular, în trombocite sau megacariocite, şi extracelular, ca un complex de proteoglicani sulfat heparinici pe matricea extracelulară şi pe suprafaţa celulelor endoteliale (18, 19).

Histamina poate declanşa CFC-S în ciclu. Această acţiune nu poate avea loc dacă sinteza sau legarea histaminei de receptorii H_2 este împiedicată. S-au descris cazuri de agranulocitoză şi leucopenie după terapia cu antagonişti ai histaminei. Intracelular, histamina poate media proliferarea ca mesager secundar. În cursul hematopoiezei indusă de IL-3 se produc mari cantităţi de histamină în măduva osoasă. Celulele care secretă această histamină nu sunt mastocite sau precursori ai acestora.

Substanţa P (SP) este un neuropeptid din grupa tahikininelor, distribuit în sistemul nervos central şi periferic, cu funcţii în controlul motor, contracţia muşchilor netezi, salivaţie, micţiune, vasodilataţie şi percepţia senzorială. Măduva osoasă este inervată cu fibre reactive — SP. Macrofagele, celulele epiteliale şi eozinofilele produc SP, iar limfocitele B şi T, celulele endoteliale şi macrofagele exprimă receptori SP. Stimulate de SP, monocitele produc IL-1, IL-6, FNTα (107).

Factorul de creştere a nervului stimulează efectul FSC-GM asupra diferenţierii bazofilelor umane şi induce eliberarea mediatorilor inflamatori din bazofilele mature.

Un agonist colinergic creşte capacitatea de răspuns a progenitorilor medulari timpurii — $CD34^+$, la stimularea cu FSC-GM.

Leucotrienele (LT) rezultă din convertirea acidului arahidonic pe calea 5-lipoxigenazei, de către granulocite şi monocite. LTB_4 favorizează procesul inflamator prin aderarea de peretele vascular, chemotaxia şi degranularea granulocitelor LTB_4 şi LTC_4 posedă efecte stimulatorii sinergice intense şi specifice asupra CFC-GM (116).

FK 506, imunosupresor puternic, este un antibiotic macrolid obținut din *Streptomyces tsukubaesis*, cu efect puternic și selectiv anti-T, similar cu al ciclosporinei A. Are efect stimulator semnificativ asupra CFC-GM și CFC-EB.

FACTORII INHIBITORI AI HEMATOPOIEZEI

Inhibitorul celulelor stem (ICS), *identic cu proteina inflamatorie a macrofagelor 1α* (PIM-1α). Inhibă proliferarea celulelor stem, fără a afecta formarea de colonii CFC-GM (21 d).

Factorul necrozant al tumorilor (FNT) și *interferonii* (IFN) α și γ sunt inhibitori, în anumite condiții, pentru toate tipurile de colonii hematopoietice și pe toate stadiile de dezvoltare.

Factorul de creștere transformator β (FCT β) are efect inhibitor asupra stadiilor timpurii ale hematopoiezei și acționează antagonic cu unele citokine care au ca țintă celule hematopoietice în stadii timpurii, ca IL-3, IL-6, FSC-GM. Inhibă sinteza ADN în CFC-EB (27).

Factorul plachetar 4 (FP4), IL-2 și IL-4 au acțiune de modulare a megacariopoiezei.

Agenții terapeutici *imunosupresori* cei mai puternici sunt: *ciclosporina A* (CsA), *FK 506* și *deoxispergualin* (DSG). CsA, un peptid ciclic derivat din fungi, inhibă selectiv activarea limfocitelor T-CD4 și a citokinelor produse de aceste celule. FK 506 are un efect puternic și selectiv antilimfocite T, similar cu al CsA. Ambele acționează specific prin inhibarea transcripției unui set limitat de gene activatoare ale limfocitelor T imature, incluzând pe cele care codifică IL-2, IL-3, IL-4 și IFN γ. Avantajul FK 506 este dat de faptul că efectul imunosupresor este obținut cu doze de 10—100 de ori mai mici decât cele inhibitorii ale hematopoiezei. Aceasta face ca FK 506 să fie preferat în tratamentul imunosupresor al pacienților cu boli hematologice supuși la chimioterapie sau iradiere (66).

Interacțiunea citokinelor. În timp ce autoînnoirea și diferențierea celulelor stem și progenitorilor sunt procese stocastice, supraviețuirea și proliferarea acestor celule sunt reglate de citokine. Studii recente au arătat că citokinele protejează celulele de apoptoză (moarte programată) (75). Unii factori sunt stimulatori sau inhibitori, dar cei mai mulți au funcții complexe în proliferarea celulelor hematopoietice. IL-4, de exemplu, are acțiuni atât stimulatorii cât și inhibitorii asupra proliferării hematopoietice. De asemenea, mulți factori posedă activități în afara sistemului hematopoietic. Unul dintre aceștia, IL-6, are efecte ce interesează celulele imunității, celulele hepatice, renale și altele. Citokinele hematopoietice au funcții multiple, interesând celule de stadii diferite. De exemplu, FSC-G stimulează proliferarea și maturarea CFC-G, dar poate declanșa proliferarea progenitorilor primitivi aflați în G_o. În același timp, FSC-G controlează dezvoltarea celulelor granulocitare până la maturație, precum și îndeplinirea funcțiilor specifice de către celulele mature. Un alt exemplu este al FSC-GM. Acesta acționează asupra CFC-GM, CFC-G, CFC-M și CFC-Eo, dar are capacitatea de a influența CFC-GEMM și CFC-EB. Acțiunea sa se poate extinde și la alte linii ce-

lulare. Împreună cu IL-2 stimulează proliferarea limfocitelor T. Poate chiar induce, sinergic cu IFN γ, expresia genei FNT α în monocite.

Pe lângă acțiuni asupra mai multor celule exercitate de același factor reglator, un alt comportament al acestor factori este de acțiune sinergică a mai multor citokine asupra aceleiași celule-țintă. De exemplu, megacariocitopoieza este sub controlul IL-3, IL-4, IL-6, IL-11, eritropoietinei, FSC-GM (tabelul 2.III). Fiecare factor are o acțiune de îndeplinit

TABELUL 2.III

Acțiuni sinergice ale factorilor reglatori ai hematopoiezei

Factori	Celule-țintă
FSCC+IL-3+FSC-GM	Celule stem pluripotente
IL-6+IL-11+IL-3+FIL+FSC-GM	Progenitori primitivi
TNF+IL-3+FSC-GM	Colonii eozinofile
IL-3+IL-5+FSC-GM	Progenitori eozinofili
IL-3+IL-6+IL-4+IL-11+Epo+FSC-GM	CFC-Meg, megacariocite
IL-6+FSC-GM	CFC-GEMM pentru diferențiere granulocitară
IL-10+IL-6+IL-1α+FNT	Limfoame B

în procesul de mare complexitate al hematopoiezei, pregătind acțiunea unui alt factor, anihilând inhibitorii sau producând alți factori. IL-1 poate stimula direct activitatea osteoclaștilor, dar cea mai importantă cale este cea indirectă asupra macrofagelor, în care induce producerea și eliberarea de factori stimulatori, care vor influența celulele progenitoare.

Rolul cromosomului 5 în hematopoieză. Pe cromosomul 5 se constată o mare aglomerare de gene ale factorilor reglatori ai hematopoiezei, unele așezate foarte aproape de altele. Cele mai apropiate sunt FSC-GM și IL-3, la o distanță de numai 9 kb.

Pe brațul lung al cromosomului 5 au fost identificate genele: IL-4, IL-5, Il-3, IL-13, FSC-GM, FSC-M, C-fms (receptorul FSC-M), factorul de creștere al celulelor endoteliale, antigenul C-14 de diferențiere a monocitelor, lanțul β al receptorului factorului de creștere derivat din plachete (FCDP), receptorul β-adrenergic.

Această situație particulară a cromosomului 5 trebuie să aibă o semnificație legată de filogeneză; de importanță clinică este faptul că deleția unei porțiuni a brațului lung al unuia din cromosomii 5 din celulele hematopoietice se exprimă prin sindromul mielodisplazic $5q^-$.

CINETICA HEMATOPOIEZEI

Procesul complex al hematopoiezei se desfășoară la adult în întregime în măduva osoasă, cu excepția precursorilor limfoizi, care își perfectează maturația în organele limfoide. Aceasta presupune un intens efort de regenerare a celulelor sanguine mature. Spre deosebire de regenerarea fiziologică a pielii și a mucoasei gastrointestinale, care are loc la capacitate maximă, măduva osoasă este dotată cu mai multă flexibilitate funcțională. Hematopoieza dispune de rezerve care îi permit

să-și moduleze răspunsul în funcție de solicitări, diferențiat pe fiecare linie celulară. Anemia acută este urmată de creșterea rapidă a numărului de progenitori și precursori eritroizi din măduvă; infecția duce la un efect similar asupra progenitorilor și precursorilor granulocitari.

Hematopoieza este un proces lung, care implică populații celulare stratificate ierarhic, de tip piramidal, de la cele mai primitive, în număr mic, până la cele diferențiate pe o anume linie sanguină, în număr din ce în ce mai mare (fig. II.5).

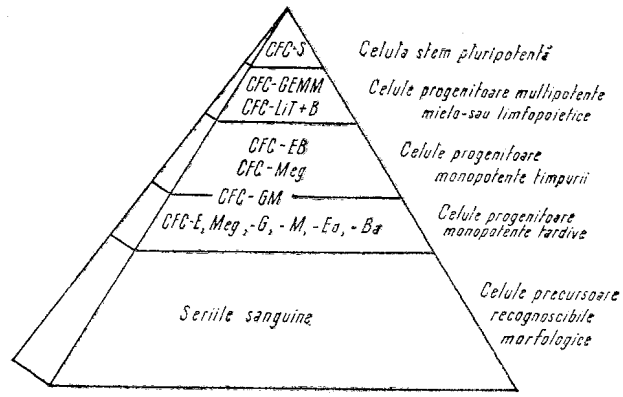


Fig. II.5. — Ierarhia piramidală a hematopoiezei.

Celula stem pluripotentă reprezintă partea superioară a piramidei. O populație celulară care nu depășește $1—2\times10^6$ elemente este la originea generării celor 2×10^{11} celule sanguine mature, zilnic. Această populație celulară este definitivă ca număr și se menține doar prin autoregenerare, fără posibilitatea vreunui aport din afară. Celulele embrionare din care s-au desprins în viața embrionară nu mai există la adult; ele s-au diferențiat ireversibil.

Deși sunt atât de puține, cea mai mare parte a CSP se află în repaus. În mod normal, hematopoieza este susținută prin activarea secvențială a diferitelor clone de celule stem. Se consideră că 90% din CSP sunt în repaus mitotic (G_0). În această stare sunt mai puțin vulnerabile la leziuni genetice produse de către agenți dependenți de ciclu (radiații ionizante, agenți alkilanți sau virusuri). Dacă, totuși, o asemenea acțiune a avut loc, CSP pot scădea cantitativ foarte mult, în unele cazuri până la 1% din valorile inițiale. Celulele stem supraviețuitoare, oricât de puține au rămas, reușesc să completeze lipsurile, prin trecerea în ciclu celular a cât mai multor celule pluripotente. Refacerea care urmează are un curs rapid, până la completarea a 10—20% din pierderi, după care rata de refacere diminuează, ajungându-se la un plafon situat sub nivelul dinaintea tratamentului. Dacă tratamentul se repetă, nivelul de refacere a celulelor stem devine și mai scăzut. În afara lezării celulelor stem pluripotente, prin astfel de tratamente se produce o afectare a micromediului hematopoietic, determinând diminuarea producerii de stimulatori hematopoietici.

Pentru menținerea în faza G_0, de supraviețuire, a celulelor stem umane, este nevoie de intervenția IL-3 și FSC-GM. Pentru ca CSP să fie scoase din faza G_0 și induse în G_1 și apoi în faza de sinteză ADN, intră în acțiune FSCS, IL-6, IL-11, FSC-G, factorul inhibitor al leucemiei (FIL), IL-12. Totodată are loc diferențierea spre celulele progenitoare multiliniare mieloide și limfoide.

A doua treaptă ierarhică este reprezentată de celulele *progenitoare multiliniare*, CFC-GEMM și CFC-LiT+B. Existența acestora este dovedită prin tehnici de cultură *in vitro* și prin experimente de transplantare. Celulele de tip medular, CFC-GEMM, sunt stimulate pentru proliferare și diferențiere de IL-3, FSCS, FSC-GEMM, IL-6 și FSC-GM. Celulele progenitoare limfoide primitive, comune liniilor B, T și NK, au un control al diferențierii efectuat de IL-3.

Următoarea treaptă, a *progenitorilor monoliniari timpurii*, ca CFC-EB, CFC-MegB și CFC-GM, este sub controlul IL-3 și FSCS, la care se adaugă factorii stimulatori specifici, FSC-EB, FSC-MegB, FSC-GM și alți stimulatori sinergici. Asupra celulelor pre-B și pre-T acționează IL-7, IL-4 și IL-3, pe linia B, și IL-4, IL-2, IL-7, pe linia T. Trecerea de la progenitorii multiliniari la cei monoliniari se face prin restricția, probabil stocastică, a unui vast repertoriu genomic existent la progenitorii multiliniari, la un program genetic specific de linie. Ca și progenitorii de pe cele 2 trepte superioare, progenitorii monoliniari timpurii se mențin în stare de repaus mitotic. Doar 10—20% din aceștia sunt în ciclu celular, având rol de rezervă hematopoietică. Din punct de vedere al structurilor antigenice de suprafață, la acest nivel se conservă antigenele CD34 și se adaugă moleculele HLA din clasele I și II. Acestea din urmă, îndeosebi HLA-DR, permit recunoașterea și interacțiunea cu celulele imunoreglatoare (limfocite T și monocite), care exprimă de asemenea determinanți de tipul HLA clasa II. De asemenea, se exprimă, în cantitate redusă, receptori pentru eritropoietină și trombopoietină. Începe sinteza hemoglobinei, adică lanțurile de globină, hemul și proteinele citoscheletului eritrocitar.

Pe treapta *precursorilor monoliniari tardivi* mieloizi, CFC-E, CFC-Meg, CFC-G, CFC-M, CFC-Eo, CFC-Ba, pe lângă factori cu acțiune generală, IL-3, FSCS, IL-6, intervin stimulatorii specifici fiecărei linii.

În acest stadiu de dezvoltare se pierd antigene ca CD34 și cele HLA-clasa a II-a. În schimb se adaugă antigene specifice. Pe CFC-E apar antigenele Rh și receptorii pentru transferină, iar receptorii eritropoietinei devin foarte numeroși.

Aceasta este populația de celule cea mai activă, cu o proliferare și diferențiere intense și cu o autoregenerare foarte redusă. Existența acestei populații celulare depinde de influxul din stadiile precedente de progenitori. La acest nivel se realizează o bună parte din flexibilitatea hematopoiezei. În cazul eritropoiezei, CFC-E se află aproape toate în mitoză, deci o cantitate mare de eritropoietină produsă de o anemie acută obligă la atragerea tuturor CFC-E în ciclu, cu mitoze însoțite de diferențiere. Spre a nu se epuiza populația CFC-E, se recurge la influxul din populația precedentă a CFC-EB. Atragerea rapidă a CFC-EB spre CFC-E a fost observată în experimente cu șoarecii policitemici, depleționați de CFC-E și precursori eritrocitari. Administrarea eritro-

poietinei atrage rapid CFC-EB spre CFC-E și proeritroblași. Această acțiune este posibilă prin scurtarea intervalelor intermitotice, limitarea diviziunilor homotipice și diferențierea fără diviziuni. Prin creșterea în continuare a tranzitului celular și accelerarea eliberării din măduvă a reticulocitelor se obține un număr mai mare de eritrocite. Deci, solicitarea acută a eritropoiezei se rezolvă printr-o diferențiere și maturare celulară accentuate. În anemia hemolitică cronică, soluția este de alt tip: amplificarea populațiilor de CFC-E și precursori eritroizi, reducându-se presiunea de diferențiere asupra CFC-EB. Culturile de colonii eritroide la acești pacienți arată un număr mare de CFC-E. Din contră, numărul de CFC-EB fluctuează mai puțin. Această populație celulară poate deveni mai activă prin inducerea în ciclu a unei mai mari proporții de celule, crescând numărul de CFC-E fără modificarea semnificativă a numărului de CFC-EB. Aceeași situație este evidentă și pe linie megacariocitară, unde creșterea numărului de megacariocite este posibilă numai prin amplificarea numărului de CFC-Meg, deoarece megacarioblastul nu se mai divide. Numărul mare de megacariocite din măduva unui pacient cu purpură trombocitopenică imunologică nu poate fi decât rezultatul unei activități intense a populațiilor de CFC-Meg pentru a-și crește numărul și a atragerii de celule din compartimentul CFC-MegB, celule aflate în mare parte în repaus. În această acțiune, pe lângă IL-3, FSCG și CFC-GM, este necesară intervenția trombopoietinei. Așa cum eritropoietina transmite semnalul hipoxiei tisulare, trombopoietina aduce mesajul unui număr de trombocite în circulație.

Pe linia limfocitară B, celulele evoluează spre plasmocit sub influența IL-3, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6. Celulele din linia T se maturează până la limfocite $TCD4^+$, sub acțiunea IL-1, IL-2, IL-6, IL-4, și limfocite $TCD8^+$, sub efectul IL-5 și IL-6.

MIGRAREA CELULELOR STEM ȘI A PROGENITORILOR HEMATOPOIETICI

Un element esențial pentru hematopoieză este *migrarea* celulelor stem, atât în cursul vieții intrauterine (fig. II.6), cât și în viața adultă (fig. II.7).

Un animal iradiat letal poate supraviețui dacă este în legătură parabiotică cu un animal intact, neiradiat. În măduva osoasă a animalului iradiat se pun în evidență celule marcate de tipul animalului pereche. Aceasta arată că refacerea hematopoiezei deprimate prin iradiere se face cu celule stem venite prin circulația sanguină de la celălalt animal. Celulele stem circulante se stabilesc în măduva osoasă atrase de micromediul hematopoietic specific. A fost purificată o moleculă de recunoaștere și de fixare a celulelor stem pe matricea extracelulară (118). Prin tehnicile cu celule marcate se demonstrează refacerea unei aplazii induse prin iradiere locală, într-un membru, cu celule migrate din alte teritorii hematopoietice ale animalului. Tehnicile coloniilor splenice (120), cultura în camera de difuziune (14, 61), cultura *in vitro* pe agar (86) au pus în evidență prezența în sângele circulant a celulelor stem pluripotente și a progenitorilor orientați. Numărul celulelor stem din circulație este în mod normal în jur de 100 de ori mai mic decît cel

din măduva osoasă. În stări de hipoxie (127), neutropenie, mielofibroză (22), numărul acestora crește considerabil.

În circulație are loc un du-te-vino neîntrerupt de celule stem (7). Unele dintre ele, celulele progenitoare limfopoietice, au un sens unic dinspre măduvă spre organele limfatice, iar celelalte celule stem migrează spre și dinspre un segment sau altul al măduvei osoase. Mo-

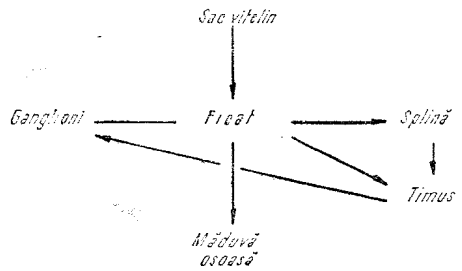


Fig. II.6. — Migrarea celulelor stem și a progenitorilor hematopoietici în viața embriofetală.

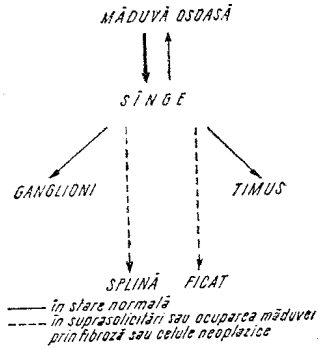


Fig. II.7. — Migrarea celulelor stem și a progenitorilor hematopoietici la adult.

tivele acestei migrări par să fie multiple: (a) intervenția celulelor stem în sectoarele măduvei osoase supuse unei solicitări mai intense; (b) căutarea de noi sedii pentru colonizarea hematopoietică (hematopoieza extramedulară din anemiile hemolitice cronice, metaplazia mieloidă, leucemii, policitemii etc.) sau (c) menținerea unei rezerve de celule stem în circulație pentru cazurile de lezare a măduvei.

Morfologia limfocitară a *celulei stem* a fost întrezărită încă de Maximov (82). Mai recent, s-a observat că în prima etapă a refacerii după iradiere, administrare de citostatice (119) sau expunere la hipoxie (127), măduva osoasă a animalelor de experiență prezintă un număr de celule cu aspect limfoid, care diminuează după câteva zile, făcând loc unor celule de aspect blastic și, mai târziu, celulelor din seriile medulare (eritroblaști, mielociți etc.). Yoffey (128) a descris drept celule stem limfocitele de tranziție, celule care morfologic se situează între limfocit și celulele cap de serie.

Deoarece celulele stem au aspect limfocitar (45), ele nu trebuie confundate cu limfocitele adevărate, cu rol imunologic bine precizat. Limfocitele din ganglioni, duct toracic, splină sau timus nu dau colonii în splină. Prin sedimentare în gradienți de densitate, limfocitele din măduvă se separă de celulele *lymphocyte-like*, formatoare de colonii. Prin centrifugări succesive ale unor fracțiuni de limfocite medulare s-a reușit o concentrare înaintată a CFC-S, până la 20% din totalul celulelor nucleate (33). Examenul morfologic, inclusiv cel în microscopie electronică, al acestui concentrat, a permis identificarea unui „candidat de celulă stem". Aceasta are mărimea de 8—10 μm, formă rotundă, nucleul rotund sau reniform, cu cromatina fin dispersată, nucleoli, cito-

plasma albastru deschis, fără granulații, cu ribosomi liberi, puține vezicule și un număr redus de mitocondrii mici; limfocitele din același concentrat celular au o cromatină nucleară mai densă, aparat Golgi, centrioli, reticul endoplasmatic, corpi denși și lizosomi. La microscopul optic deosebirea dintre cele două feluri de „limfocite" nu este posibilă.

Dimensiunile celulelor stem variază de la celule cu diametrul unui limfocit mic până la celule cu diametrul celulelor blastice, cu predominanța dimensiunilor mici la hematopoieza adultă și a dimensiunilor mari în stadiul embrionar (86). Aceste diferențe sunt date în parte de starea funcțională diferită a celor două populații de celule stem din punct de vedere proliferativ, mai active la embrion decât la adult. În concentratele de CSP la adult se observă celule blastice de dimensiuni mici și mijlocii. Din analiza ciclului celular rezultă că cele mici sunt celule în repaus, iar cele mai mari sintetizează activ, ADN, ARN și proteinele necesare diviziunii și diferențierii (43).

HEMATOPOIEZA EMBRIOFETALĂ

Hamatopoieza apare pentru prima dată în insulele sanguine ale mezodermului sacului vitelin *(area vasculosa)* — insulele Wolff și Pander. Prin dezvoltarea extraembrionară în sacul vitelin, a hematopoiezei, ca și a celulelor germinale, se asigură scoaterea de sub presiunea diferențierii embrionare timpurii a unor țesuturi vitale pentru supraviețuirea individului și a speciei. Celulele mezodermale se deplasează din regiunea „liniei primitive" a blastodermului primitiv către sacul vitelin.

Primele celule ale insulelor sanguine sunt hemangioblaști. Hemangioblaștii insulelor sanguine se diferențiază în două direcții: (a) celulele periferice se dispun într-o rețea neregulată, plată, de celule alungite cu prelungiri care se unesc formând un tub endotelial, vas sanguin primitiv; (b) celulele centrale se rotunjesc, se detașează de cele periferice și citoplasma lor devine intens bazofilă.

Din hemoblaștii cuprinși în vasele sanguine primitive se diferențiază eritroblaștii primitivi, cu o morfologie asemănătoare megaloblaștilor. Deși sunt capabili să evolueze până la stadiul de oxifili, eritroblaștii primitivi nu-și pierd nucleul, au un volum gigant și o durată de viață mai scurtă decât eritrocitul adult. Hemoglobina sintetizată la început este cu globină de tip $\zeta_2\varepsilon_2$ (hemoglobină Gower 1), apoi, destul de repede, apare sinteza lanțurilor α, dând globină de tipul $\alpha_2\varepsilon_2$ (hemoglobina Gower 2). Lanțurile ζ (zeta) sunt precursori ai lanțurilor α, iar lanțurile ε (epsilon) ai lanțurilor β. Transferați la șoareci adulți iradiați, eritroblaștii primitivi sintetizează hemoglobina A, dovadă că au capacitatea de a sintetiza orice hemoglobină, dar mediul mezoendodermal al sacului vitelin permite exprimarea numai a genelor care controlează sinteza hemoglobinelor Gower 1 și Gower 2, precum și, în mai mică măsură, a hemoglobinei Portland ($\zeta_2\gamma_2$).

Hematopoieza din sacul vitelin începe din săptămâna a treia (mai precis în zilele a 18-a — a 19-a) și durează până în săptămâna a zecea a vieții embrionare, dar diminuează încă din săptămâna a șasea. În

afara eritropoiezei, care se pare că funcționează la nivel maxim, neinfluențată experimental prin administrarea de eritropoietină exogenă, la unele specii de mamifere se pun în evidență precursorii granulocitari și megacariocite. La om și la șoarece este evidentă numai eritropoieza (86). Cu toate acestea, celulele formatoare de colonii splenice (CFC-S) detec-

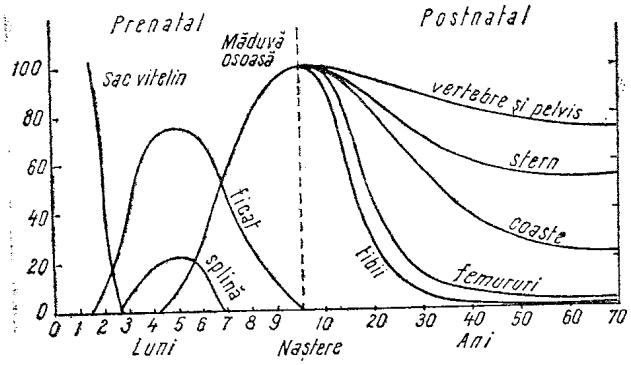


Fig. II.8. — Evoluția hematopoiezei pre- și postnatal.

tate în sacul vitelin se diferențiază pe toate liniile celulare sanguine, inclusiv cea limfatică, dacă sunt transplantate într-un organism adult. De asemenea, celulele formatoare de colonii în cultură (CFC-GM) sunt prezente în insulele sanguine primitive, dar diferențierea lor granulocitară este redusă, iar cea monocitară absentă în mediul sacului vitelin.

Experimente ingenioase și convingătoare (86) au demonstrat că, din momentul în care activitatea hematopoietică a sacului vitelin începe să scadă, celulele stem (CFC-S) și celulele progenitoare (CFC-GM) migrează către organele care preiau această activitate și care le oferă un mediu corespunzător de dezvoltare. Prin migrări succesive, celulele stem ale sacului vitelin ajung în măduva osoasă, asigurând hematopoieza la adult (fig. II.8). Micromediul hematopoietic al unui organ fetal se constituie, de asemenea, prin migrarea celulelor stromale în același sens cu al celulelor stem, dar precedând însămânțarea organului cu celule stem. Numai după ce elementele stromale au realizat un mediu favorabil în ficat, celulele stem din sacul vitelin migrează spre acest organ. Același fenomen se repetă în etapele splenică și medulară ale hematopoiezei fetale (123).

Hematopoieza hepatică începe din săptămâna a șasea și ajunge la maximum de dezvoltare între lunile a treia și a cincea, după care descrește treptat până la naștere. Sediul hematopoiezei este extravascular, în parenchimul hepatic.

Eritrocitele produse de eritroblaștii hepatici sunt anucleate, mai mici, dar încă macrocitare față de eritrocitele adultului și conțin hemoglobina F ($\alpha_2\gamma_2$). Pe măsură ce volumul eritrocitelor scade, numărul lor crește de la aproximativ un milion în lunile a doua și a treia, la 3 milioane/μl în luna a cincea. Celulele seriei granulocitare sunt prezente, dar în număr redus, deși CFC-GM sunt în număr mare. Megacariocitele sunt, de asemenea, prezente. Se pun în evidență precursori ai limfocitelor T și B, iar CFC-S din ficatul embrionar repopulează și organele limfatice ale adultului, inducând sinteza de imunoglobuline și imunitatea mediată celular.

Splina devine organ hematopoietic de tip „mieloid" între săptămânile a noua și a zecea, prin atragerea de celule stem migrate din ficat. După o activitate maximă la patru luni, mult mai redusă decât a ficatului, splina devine inactivă din punct de vedere mieloid după luna a șasea.

Încă din perioada de declin a „mielopoiezei" apare limfopoieza splenică, crescând în intensitate până la naștere. La șoarece, splina rămâne și în viața adultă organ hematopoietic „mieloid". La om însă, ea reprezintă după naștere unul din organele limfoide periferice sau secundare. Cu toate acestea, splina umană păstrează o parte din potența hematopoietică prenatală, putând deveni, în condiții deosebite (anemii cronice, leucemii, mielosclerozâ), sediul unei hematopoieze extramedulare. Limfopoieza splenică fetală este independentă de stimularea antigenică, fiind foarte redusă.

Timusul devine limfopoietic la embrionul uman în săptămâna a noua, fiind însămânțat cu celule stem de ficat, splină și în cele din urmă din măduva osoasă.

Limfopoieza din ganglionii limfatici apare în săptămâna a douăsprezecea, cam în același timp cu cea din splină, întreținută de timus și măduva osoasă (sau bursa lui Fabricius la păsări).

Migrarea progenitorilor hematopoietici are loc atunci când un organ își pierde potențialul de *„homing"*. Celulele migrează spre alte țesuturi în care s-a dezvoltat acest potențial. Prin tehnica de transplantare *„in utero"* și studii de marcare celulară s-a dovedit că *„homing*-ul" are o ierarhizare a preferințelor. Celulele stem preferă măduva osoasă, dar numai atunci când aceasta este pregătită să le primească. Prin luna a 4-a apar cavitățile osoase primitive. Primele celule care se dezvoltă sunt celulele stromale și celelalte elemente ale micromediului hematopoietic. În luna a 5-a celulele stem și progenitorii eritroizi și granulocitari se stabilesc în măduvă, în cavitățile medulare primitive, începând cu clavicula. Deși ficatul și splina mai păstrează un oarecare potențial hematopoietic, măduva osoasă preia rolul de organ hematopoietic principal (91), devenind unicul după naștere.

PATOLOGIA HEMATOPOIEZEI

Hematopoieza poate fi lezată în cele două compartimente celulare care o compun: (a) celulele stem pluripotente sau cele cu orientare spre o linie celulară — celule progenitoare hematopoietice și/sau (b) celulele stromale, care asigură micromediul hematopoietic. De cele mai multe ori, cele două compartimente sunt lezate concomitent, dar dacă celulele hematopoietice pot fi investigate extensiv în prezent, cele stromale sunt mai greu accesibile studiului, metodele de investigare fiind în curs de dezvoltare.

Ca multe alte populații celulare, celulele stem pluripotente pot fi afectate prin 3 procese patologice: *diminuare* (hipoplazie-aplazie), *exces* (hiperplazie) sau *alterare calitativă* (displazie).

Aplazia medulară este rezultatul scăderii severe a celulelor stem. În aplazia monoliniară eritroidă, granulocitară sau megacariocitară, defectul

este situat la nivelul celulelor progenitoare. În aplazia medulară globală este interesată celula progenitoare mieloidă (un stadiu intermediar între celula stem pluripotentă și celulele progenitoare monoliniare), pentru ca în unele forme să se pună în evidență și limfopenia, semn al afectării celulelor stem pluripotente. Nu este cunoscut în ce măsură participă la acest proces și celulele stromale, dar alterarea celulelor stem este pe primul plan, deoarece transplantarea de celule stem normale duce la restabilirea celulară și funcțională a măduvei. Uneori, pacienții cu aplazie medulară dezvoltă în cursul bolii o anomalie citogenetică clonală, care poate să rămână fără consecințe, dar poate, de asemenea, să reprezinte o orientare premalignă — sindrom mielodisplazic — sau malignă — leucemie acută (4) (pentru detalii vezi capitolul Anemiile aplastice).

Patologia de exces, mieloproliferarea cronică sau acută, interesează, de asemenea, diverse nivele ale celulelor stem și precursorilor orientați. Hiperplazia măduvei osoase din sindromul mieloproliferativ cronic este globală, dar cu predominanța eritroblastică în *policitemia vera,* granulocitară în *leucemia granulocitară cronică* și megacariocitară în *trombocitemia hemoragică.* În aceste cazuri, celulele tuturor liniilor sanguine sunt afectate, poartă markeri clonali ca, de exemplu, cromosomul Ph_1, dar fenotipic se exprimă o singură serie. De fapt, toate aceste afecțiuni prezintă forme clinice și morfologice intricate, cu exces de trombocite în policitemia vera sau de granulocite în trombocitemia hemoragică. Al patrulea membru al sindromului mieloproliferativ, mielofibroza cu metaplazie mieloidă, este și mai proteiform, cu hiperplazie inițială și hipoplazie mai târziu, cu anemie sau exces de trombocite (pentru detalii vezi capitolul Sindroame mieloproliferative).

Sindroamele mielodisplazice se caracterizează prin *modificări calitative* ale celulelor hematopoietice, pe una sau mai multe linii. Anomaliile de diferențiere și de maturare duc la alterări morfologice, biochimice și cromosomale. Efectul funcțional este ineficiența hematopoiezei, cu citopenie sanguină. În cursul evoluției sindroamelor mielodisplazice pot apărea episoade aplazice sau de mieloproliferare. De asemenea, într-o mieloproliferare pot fi observate manifestări displazice (pentru detalii vezi capitolul Bolile mielodisplazice).

O problemă care a fost discutată privește relația dintre factorii de creștere (stimulatori) ai hematopoiezei și leucemogeneză sau oncogeneză, în general. Se pleacă de la ideea că factorii de creștere asigură autoregenerarea și diferențierea celulelor stem. Un dezechilibru în funcționarea acestei reglări poate duce la o proliferare necontrolată, în dauna diferențierii.

Caracterul de proliferare perpetuă, de „imortalitate", este propriu celulelor stem și celulelor maligne. Deosebirea este că această capacitate de proliferare, de autoîntreținere a unei populații celulare, este modelată și controlată de intervenția factorilor reglatori, în cazul celulelor stem normale, și este anarhică, fără finalitate, fără limită, la celulele neoplazice. Caracterul de „imortalitate" poate fi indus unei populații celulare normale *in vitro* prin adăugarea continuă a unui factor de creștere, de exemplu IL-3, care susține proliferarea continuă a celulelor stem pluripotente, a precursorilor granulomonocitari și a mastocitelor. În aceste

condiții, cultura crește indefinit, celulele păstrează o morfologie primitivă, cu un cariotip diploid normal și sunt neleucemice, adică nu produc tumori sau leucemie după transplantarea *in vivo*. Presiunea de diferențiere la care sunt supuse celulele *in vivo* decuplează răspunsul proliferativ la IL-3. După câțiva ani de cultură *in vitro*, celulele crescute prin stimulare continuă cu IL-3 și FSC-GM dobândesc variate anomalii cariotipice. Cu timpul, capacitatea de diferențiere și maturare este blocată, dar celulele nu sunt tumorigene *in vivo*. Dacă însă celulele liniei stimulate continuu sunt infectate cu un retrovirus recombinant ce conține o secvență codificată pentru FSC-Gm, celulele cresc *in vitro* fără adaosul de factor de creștere și devin tumorigene prin injectare *in vivo* (31). Este un exemplu de menținere a capacității de proliferare și de transformare malignă prin producerea directă de către populația celulară a factorilor de creștere. Trebuie notat că celulele supuse acestei stimulări „autocrine" erau instabile cariotipic și blocate în diferențiere și maturare.

Dacă aceeași populație celulară este pusă în contact (transfectată) cu virusuri purtând oncogenele *myc* sau *abl*, celulele cresc independent de factorii de creștere și devin tumorigene *in vivo*. Acest comportament nu este asociat cu un mecanism „autocrin". Apare astfel un alt exemplu de modalitate de malignizare, în care produsele oncogenelor *myc* și *abl* au „*by-pass*"-at cerințele celulelor de factor normal de creștere (124).

În mod obișnuit se consideră că celulele leucemice apar ca o consecință a exprimării oncogenelor în celulele hematopoietice. Celulele răspund aberant la stimulii reglatori stromali normali și se dezvoltă aberant. O opinie diferită este exprimată de Dexter și colab. (30), în concluzia unor experimente în care s-a folosit un retrovirus recombinant a cărui oncogenă *v-src* aviară a fost inserată într-un virus de leucemie murină *src* (MOMuLV). Cu acest virus au fost infectate culturi celulare de măduvă osoasă pe termen lung. Celulele CFC—GEMM au crescut indefinit, dar nu s-a putut demonstra integrarea *src* (MOMuLV) în aceste celule. De asemenea, CFC—GEMM nu au exprimat activitate de proteinkinază codificată de oncogene *v-src*. Deci, nici integrarea, nici exprimarea oncogenelor *src* nu sunt necesare pentru menținerea liniei de celule stem. Se pare că infecția *src* (MOMuLV) duce la transformarea celulelor stromale și la alterarea mediului reglator natural. Exprimarea oncogenelor în celulele stromale duce la un dezechilibru al semnalelor de creștere și diferențiere, precum și al selecției celulelor hematopoietice, care pot supraviețui și crește în aceste condiții nefavorabile de mediu. Aceste celule pot să nu fie leucemice, pentru că răspund încă la semnalele de diferențiere, dar au un avantaj selectiv față de omologii normali, iar clonele de celule modificate pot să ocupe o bună parte a teritoriilor hematopoietice. Un fapt asemănător se petrece în leucemia granulocitară cronică cu privire la avantajul de creștere a celulelor Ph_1 pozitive. Când celulele suferă modificări în continuare, apare leucemia, celulele devenind insensibile la stimulii de diferențiere. În concluzie, pentru leucemogeneză apar necesare două modificări independente: una interesând procesul de autoregenerare, având drept consecință avantajul clonal; și alta vizând diferențierea și ducând la inhibiția maturării.

Factorul de creştere dependent de plachete (FCDP) poate avea rol în oncogeneză. Un lanţ polipeptidic din compoziţia sa este omolog cu secvenţa aminoacizilor proteinei p^{28} *v-sis*, proteina transformatoare a virusului sarcomului simian (SSV). FCDP este prezent în celulele transformate — SSV şi este secretat în mediu unde interacţionează cu receptorii de suprafaţă ai FCDP (17).

De o mare atenţie se bucură în prezent manevrarea genetică a celulelor stem. Ca vectori se folosesc retrovirusuri prin intermediul cărora se inserează ADN din genomul viral în genomul gazdei. Provocându-se deleţie unei gene din retrovirus şi suprainfectându-se cu un virus *helper*, se obţin particule defecte din punctul de vedere al replicării. Acestea servesc drept vectori pentru introducerea de material străin în genomul celulelor stem (32).

Leucemiile acute sau cronice sunt boli clonale, dezvoltându-se dintr-o celulă stem transformată. În leucemia granulocitară cronică, interesarea celulei stem pluripotente este evidentă prin detectarea anomaliilor clonei leucemiei granulocitare cronice în toate celulele sanguine mature.

Dezvoltarea unei leucemii într-o celulă stem se bazează pe faptul că replicarea ADN este conservativă, templatul benzii ADN este mai probabil prezent într-o celulă stem fiică decât în progenul diferenţiat în cursul unei mitoze. Prin urmare, este posibil ca o celulă stem să acumuleze mai multe mutaţii, prin diviziuni succesive, decât progenul mai diferenţiat. Deoarece leucemia este o afecţiune ce evoluează în mai multe trepte timp îndelungat, este posibil ca ADN dintr-o celulă stem să acumuleze suficiente mutaţii pentru ca leucemia să devină evidentă (52).

Celulele leucemiei acute mieloblastice (LAM) sunt dependente de factori de creştere, *in vitro*. IL-3, FSC-GM şi FSC-G induc colonii leucemice sau activează sinteza ADN în 80% din cazuri. Combinaţia IL-3, FSC-GM şi FSC-G măreşte acţiunea proliferativă a progenitorilor LAM. FSCS amplifică de 10—20 de ori activitatea stimulatorie a IL-3, FSC-GM şi FSC-G.

Deşi progenitorii LAM răspund la stimularea factorilor de creştere hematopoietică, maturaţia celulară este slabă sub influenţa acestor factori. În această situaţie, apoptoza (moartea celulară programată, fiziologică, asociată cu extincţia celulelor diferenţiate terminale) nu se poate produce şi celulele îşi păstrează capacitatea de proliferare indefinit. Maturarea poate fi indusă numai dacă în clonele maligne se restaurează capacitatea de diferenţiere. În leucemia acută promielocitară (LAP) (M_3), blocul de maturare a celulelor cu translocaţie tipică t (15 : 17) poate fi anulat prin inducerea diferenţierii de către acidul retinoic. De asemenea, în LAM cu translocaţia cromosomială t (8 : 21), FSC-G a indus maturarea granulocitară, *in vitro* (81).

Mecanisme autocrine de creştere pot face neoplasmele independente de stimularea factorilor de creştere exogeni, îndepărtând astfel un mecanism normal al controlului creşterii. Experimental, stimularea factorilor de creştere autocrini poate fi un pas important în leucemogeneza mieloidă. Creşterea autocrină poate apărea exclusiv prin acţiunea intracelulară, fără a avea nevoie de excreţia factorului de creştere şi ulterioara activare a receptorilor exprimaţi pe membrana celulară. Celulele

blastice pot produce factori de creştere (FSC-GM, G sau M) şi alte citokine (IL-6, IL-1, FNT). IL-6 şi FSC-GM au efect autocrin în LAM-M_4 (3), iar IL-11 în leucemia acută megacariocitară. Cazurile de LAM cu creştere autocrină intensă au un prognostic mai sever, caracterizează o formă mai agresivă de boală. Cu toate acestea, stimularea creşterii autocrine nu este suficientă pentru a induce leucemia. Aceasta trebuie însoţită de alte modificări genetice care blochează diferenţierea (81).

În leucemia acută limfoblastică (LAL) au fost testaţi, *in vitro*, factori produşi de celule stromale: IL-7, FSCS, IL-11. Nici singuri, nici asociaţi, ei nu au produs un efect stimulator. În cazul FSCS, faptul se explică prin lipsa exprimării pe celulele LAL a receptorilor c-kit.

În LGC, celulele stromale stimulate cu IL-1β produc, pe lângă alţi factori, o cantitate crescută de IL-1β care acţionează autocrin asupra clonei maligne. Tratamentul cu IFN α reduce clona leucemică prin efect antiproliferativ, modularea expresiei moleculelor adezive de celulele hematopoietice şi celulele stromale, reglarea eliberării citokinelor de celulele stromale, inhibând producerea IL-8, IL-1 şi FSC-GM (102).

De asemenea, este în studiu interceptarea factorului IL-1β sau a receptorului IL-1β de către IL-4 şi antagonişti ai receptorului IL-1β. Este posibil ca în acest mod să se pună bazele unei noi strategii terapeutice în LGC (43).

UTILIZAREA FACTORILOR STIMULATORI AI HEMATOPOIEZEI ÎN PATOLOGIE

Introducerea în ultimii ani a preparării în cantităţi mai mari de factori stimulatori ai hematopoiezei prin tehnologia ADN recombinant, în prezent în curs de extindere, a deschis calea pentru utilizarea lor pe o scară ce va deveni probabil tot mai largă şi mai variată în terapeutica unor afecţiuni sanguine, a unor tumori şi a altor boli.

Neutropeniile care beneficiază de un tratament cu FSC-G, FSC-GM şi IL-3 pot fi cele din bolile maligne sau nemaligne. După tratamente cu citostatice sau iradiere şi după transplantarea de măduvă osoasă se poate ajunge la neutropenii severe, care pun în pericol viaţa pacientului prin infecţii de mare gravitate şi obligă la întreruperea pentru lungă durată a tratamentului. Administrarea FSC-G sau FSC-GM se poate face *profilactic*, la toţi pacienţii, *din prevedere*, la pacienţii cu risc crescut de neutropenie, sau *terapeutic*, la pacienţii neutropenici febrili. Costul mare al preparatelor nu permite administrarea profilactică. La celelalte categorii, administrarea factorilor stimulatori are ca rezultat creşterea în decurs de o săptămână a numărului de neutrofile. În acest fel, se previne sau se tratează eficient consecinţele infecţioase, se scurtează durata spitalizării, iar la pacienţii care fac chimioterapie se pot respecta intervalele scurte dintre cure prin care se asigură un efect sporit al tratamentului. Teama de favorizare a creşterii ţesutului neoplazic de către factorii de stimulare utilizaţi nu a fost confirmată până în prezent. Rezul-

tatele obținute în *hairy cell leukemia* se datoresc reducerii riscului de infecții, mai ales dacă se impune splenectomia. Aceleași rezultate se obțin după transplantarea de măduvă osoasă, unde prin scurtarea duratei neutropeniei se reduce rata mortalității precoce. În SIDA, se asigură o prevenire a complicațiilor fatale, prin creșterea numărului de neutrofile, dar și prin refacerea funcțiilor de fagocitoză și bactericide a neutrofilelor, îndeosebi pentru stafilococi. Tratamentul cu FSC-GM poate corecta defectul în generarea superoxidului din mielodisplazii și după transplantarea de măduvă.

Alte neutropenii sau defecte funcționale ce pot fi tratate cu factori stimulatori sunt neutropenia congenitală, neutropenia ciclică, disfuncția granulocitară congenitală sau dobândită, sindromul Felty, aplazia indusă medicamentos, arsurile (64, 105).

Tratamentul combinat al factorilor stimulatori cu agenți imunosupresori s-a arătat util în câteva cazuri de anemie aplastică severă.

În *mielodisplazii*, atât de rezistente la diverse terapii, utilizarea FSC-GM, FSC-G și IL-3, singuri sau în asociere, au arătat o refacere a citopeniei în 20—30% din cazuri, prin inducerea diferențierii și maturării clonei hematopoietice patologice. În unele cazuri, rezultatele au fost de lungă durată. De asemenea, tratamentul cu eritropoietină umană recombinată a dus la obținerea de remisiuni în 22% din cazuri (59). Tratamentul cu IL-3 nu este eficace decât parțial, cu obținerea de remisiuni de scurtă durată (53). Rezultate superioare, cu creșterea numărului de neutrofile, au avut tratamentele cu FSC-G uman recombinant.

În obținerea unui *număr crescut de celule stem* și progenitori hematopoietici în sângele periferic, de unde să fie prelevate pentru transplantare autologă, a fost utilizat FSC-G. Dar, creșterea numărului de celule stem a facilitat chimioterapia cu doze foarte mici, „mieloablative". Pe de altă parte, tratamentul cu FSC-G poate induce în ciclu o mai mare cantitate de celule neoplazice, pregătind terenul pentru chimioterapie.

În unele *sindroame hemoragice* se administrează IL-11 uman recombinant, având ca rezultat creșterea numărului de progenitori megacariocitari, stimularea endoreplicării megacariocitelor și creșterea numărului de trombocite.

Anemia din insuficiența renală cronică are ca tratament de bază administrarea de eritropoietină. Rezultatele sunt bune, cu creșterea numărului de eritrocite, dar de scurtă durată. Beneficiul major ar putea fi realizat în cazul supunerii pacientului la o operație. Eritropoietina poate fi utilizată și în stările fără deficiență a eritropoietinei endogene, dar cu un răspuns suboptimal la eritropoietină, la donatorii de sânge, înainte și după operații, în anemiile produse de boli cronice. De asemenea, ar putea avea întrebuințare la creșterea capacității de transport de oxigen la sportivi cu efort fizic mare.

Protecția celulelor stem față de iradiere include administrarea factorilor de creștere. O accelerare a refacerii după iradiere se face prin administrare de IL-1, FSC-G și FSCS. Tratamentul făcut înainte de iradiere protejează populația de progenitori hematopoietici. Această acțiune este egalată numai de FNT α, administrat cu 20 de ore înaintea iradierii.

Efectul se produce prin inducerea celulelor progenitoare în faza S tardivă, radiorezistentă, a ciclului celular. În plus, sunt induse enzime antioxidante, ca superoxid dismutaza manganului care protejează celulele împotriva radicalilor liberi nocivi (41). FSC-G administrat la câini iradiați letal reface hematopoieza la 50% din animale. Un efect similar, dar cu o refacere mai rapidă a trombocitelor, se obține cu FSCS (111). Pentru protecția față de dozele letale de iradiere, la șoareci, sunt necesare IL-1, FNT, IL-6 și FSCS (94).

BIBLIOGRAFIE

1. AIZAWA S., TAVASSOLI M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1978; 84: 4485.
2. AKAHANE K. și colab.: Int. J. Cell. Cloning 1987; 5: 16.
3. AKASHI K. și colab.: J. Clin. Invest. 1991; 88: 223.
4. APPELBAUM F. R. și colab.: Exp. Hematol. 1987; 15: 1134.
5. AVRAHAM H. și colab.: Blood 1992; 79 (2): 365.
6. BAGBY C. C. și colab.: J. Clin. Invest. 1986; 78: 1316.
7. BARNES D. W. H., OXON B. M.: Lancet 1967; 3: 1138.
8. BAUMANN M. A., PAUL C. L., GRACE M. J.: Am. J. Hematol. 1992; 39: 269.
9. BENJAMIN D., KNOBLOCH T. J., DAYTON M. A.: Blood 1992; 80: 1289.
10. BERCEANU ȘT., GOCIU M., GROZEA P.: Sistemul reticulo-endotelial. Edit. Medicală, București, 1976.
11. BERCEANU ȘT., GOCIU M., RĂILEANU-MOTOIU I.: Biologia celulelor sistemului limfo-reticular hematopoietic în culturi de țesuturi. Edit. Academiei R.S.R., București, 1969.
12. BOLHUIS R. L. H. și colab.: Clin. Immunol. Allergol. 1986; 6: 29.
13. BOTNIC L. E. și colab.: Int. J. Radiol. Oncol. 1979; 5: 1621.
14. BOYUM A., BORGSTRÖM R.: Scand. J. Haematol. 1970; 7: 294.
15. BRANDT S. J. și colab.: N. Engl. J. Med. 1988; 318: 869.
16. BRODSKY I. și colab.: Cancer Genet. Cytogenet. 1987; 26: 15.
17. BROWN T. J. și colab.: Blood 1993; 82: 33.
18. BRUNNER G. și colab.: J. Cell. Biol. 1991; 114: 1275.
19. BRUNNER G. și colab.: Blood 1993; 81 (3): 631.
20. CANELLOS G. P., GRIFFIN J. D.: Semin. Oncol. 1985; 12: 281.
21. CARACCIOL D., CLARK S. C., ROVERA G.: Blood 1989; 73: 366.
22. CHEVERNNICK P. A.: Blood 1973; 41: 67.
23. CLARK S. C., KAMEN R.: Science 1987; 236: 1229.
24. COULOMBEL L. și colab.: Nouv. Rev. Fr. Hematol. 1987; 29: 29.
25. DAI W., MURPHY Jr. J.: Blood 1993; 81: 1214.
26. DENBURG J. A., SILVER J. E., ABRAMS J. S.: Blood 1991; 77: 1462.
27. DEL RIZZO D. F. și colab.: Exp. Hematol. 1990; 18: 138.
28. DELWEL R. și colab.: Leukemia 1990; 4: 557.
29. DENEL T. F. și colab.: Cancer Surveys 1985; 4: 633.
30. DEXTER T. M. și colab.: J. Cell. Sci. 1985; suppl. 3: 83.
31. DEXTER T. M., MOORE M.: Carcinogenesis 1986; 7: 509.
32. DICK J. E. și colab.: Trends. Genet. 1986; 2: 165.
33. DICKE K. A., VAN NOORD M. J., MAAT B.: Haematopoietic stem cells, CIBA Found. Symposium, Assoc. Sci. Publ. Amsterdam, 1973.
34. DINARELLO C. A.: Blood 1991; 77: 1627.
35. DI PERSIO J. F., AGGARWAL S., SOLDE D. W.: Blood 1990; 76: 179.
36. DOKTER W. H. A. și colab.: Blood 1993; 81: 337.
37. DONAHUE R. E., YANG Y. C., CLARK S. S.: Blood 1990; 77: 2271.
38. DUNLOP D. J. și colab.: Blood 1992; 79: 2221.
39. DUNN A. R.: Haematologie 1987; 72: 81.
40. EAVES C. și colab.: Leukemia 1992; 6 (suppl. 1): 27.
41. EASTGATE J. și colab.: Blood 1993; 81: 639.
42. EID J. și colab.: Eur. J. Haematol. 1987; 38: 279.
43. EMERSON S. G.: În Hoffman R. și colab. (eds.): Hematology. Churchill Livingstone, New York, 1991, 72.

44. ESTROV Z.: Sem. Hematol. 1993; 30 (supl. 3): 35.
45. EVERETT N. B., CAFFREY R. W.: The lymphocyte in immunology and haemopoiesis. A. Arnold, Londra, 1967.
46. FIALKOW P. J. şi colab.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1967; 58: 468.
47. FIALKOW P. J. şi colab.: Blood 1981; 57: 1068.
48. FINNE P. H., HALVORSEN S.: Arch. Dis. Child. 1972; 47: 583.
49. FLIEDNER T. M. şi colab.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 1985; 459: 73.
50. FREEDMAN A. S., NADLER L. M.: Sem. Hematol. 1987; 24: 230.
51. GALE R. P.: Exp. Hematol. 1985; 13 (supl. 16): 3.
52. GALE R. P., BUTTURINI A.: Leukemia 1992; 6 (supl. 1): 80.
53. GANSER A. şi colab.: Blood 1990; 76: 455.
54. GOLDE D. W., CLINE M. J.: J. Clin. Invest. 1972; 51: 981.
55. GOLDE D. W.: Int. J. Cell Cloning 1990; 8 (supl. 1): 4.
56. GOLDWASSER E.: Blood cells 1984; 10: 147.
57. GORIN N. C.: Clin. Haematol. 1986; 15: 19.
58. GREAVES M. F. şi colab.: Leukemia 1992; 6 (supl. 1): 31—36.
59. GREENBERG P. L.: Semin. Oncol. 1992; 19: 106.
60. GRIFFIN J. D., YOUNG D. C.: Clin. Haematol. 1986; 15: 995.
61. GRIGORIU G., ANTONESCU M., IERCAN E.: Blood 1971; 37: 187.
62. GROOPMAN J. E. şi colab.: N. Engl. J. Med. 1989; 321: 1449.
63. HAAS J. R., BONNE F., FLIEDNER T. M.: Cell Tissue Kinet. 1971; 4: 31.
64. HAST R. şi HELLSTRÖM E.: Leukemia Res. 1992; 16: 95.
65. HEAL J. M., WEST B. L., BRIGHTMAN A.: Transfusion 1986; 26: 136.
66. HIRAO A., KAWANO Y., TAKANE Y.: Blood 1993; 81 (5): 1179.
67. HIRAYAMA F. şi colab.: J. Call Biochem. (suppl.) 1983; 17 B: 225.
68. HOFFMAN R. şi colab.: Blood cells 1987; 13: 75.
69. HUMBLET Y. şi colab.: Bone Marrow Transplant 1988; 3: 53.
70. KANZ L., LÖHR G. W., FANSER A. A.: Blood 1986; 68: 991.
71. KAWAKITA M. şi colab.: Br. J. Haematol. 1986; 62: 715.
72. KAWANO M. şi colab.: Nature 1988; 332: 83.
73. KLEIN B. şi BATAILLE R.: Hematol. Oncol. Clin. N. Am. 1992; 6: 273.
74. KNECHT H., STREULI R. A.: Acta Haematol. 1985; 74: 208.
75. KONRY M. J.: Exp. Hematol. 1992; 20: 391.
76. KRANTZ S. B.: Blood 1991; 77: 419.
77. LE BEAN M. M. şi colab.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987; 84: 913.
78. LEE M., SEGAL G. M., BAGBY G. C.: Exp. Hematol, 1987; 15: 983.
79. LICHTMAN M. A.: În Williams W. J., Beutler E., Erslev A. J. Lichtman M. A. (eds.): Hematology. McGraw-Hill Book Comp. New York, 1983, 704.
80. LORENZO J. A. şi colab.: J. Clin. Invest. 1987; 80: 160.
81. LÖWENBERG B., TOUW J. P.: Blood 1992; 8 (2): 281.
82. MAXIMOV A. A.: Folia Haematol. (Leipzig) 1909; 8: 125.
83. MCDONALD T. P.: Int. J. Cell. Cloning 1989; 7: 139.
84. McLEOD D. L., SHREEVE M. M., AXELRAD A. A.: Blood 1974; 44: 517.
85. MERZ H. şi colab.: Blood 1991; 78: 1311.
86. METCALF D., MOORE M. A. S.: Haemopoietic cells. North Holland, Amsterdam, 1971.
87. METCALF D.: Blood 1986; 67: 257.
88. METCALF D.: Immunol. Cell. Biol. 1987; 65: 35.
89. MICHALEVICZ R. şi colab.: Br. J. Haematol. 1986; 63: 591.
90. MIYAUCHI J. şi colab.: Blood 1987; 70: 657.
91. MOORE M. A. S., METCALF D.: Br. J. Haematol. 1970; 18: 279.
92. MORRISSEY P. J. şi colab.: J. Immunol. 1987; 139: 1113.
93. MOSSALAYI M. D. şi colab.: Int. J. Cell. Cloning 1984; 2: 34.
94. NETA R. şi colab.: Blood 1993; 81: 324.
95. NOVALES J. S. şi colab.: Blood 1993; 81: 923.
96. OGAWA M.: Blood 1993; 81: 2844.
97. OWEN M. E., CAVE J., JOYNER C. J.: J. Cell. Sci. 1987; 87: 731.
98. PALACIOS R., SAMARIDIS J.: Blood 1993; 81: 1222.
99. PAPAYANOROPOULOU T., BRICE M., BLAU A.: Blood 1993; 81: 299.
100. PARKER J. W., METCALF D.: J. Immunol. 1974; 112: 502.
101. PAUL C. C. şi colab.: Blood 1993; 81 (5): 1193.

102. PERSCHEL C. şi colab.: Sem. Hematol. 1993; 30 (supl. 3): 28.
103. PERSCHEL C.: Blood 1987; 70: 254.
104. PIKE B. L., ROBINSON W. A.: J. Cell Physiol. 1970; 76: 77.
105. PLUDA J. M.: Blood 1990; 76: 463.
106. QUESENBERRY P. J.: Int. J. Cell Cloning 1986; 4: 3.
107. RAMESHWAR P., GANEA D., GASCON P.: Blood 1993; 81: 391.
108. ROSENFELD M. şi colab.: Leukemia Res. 1985; 9: 427.
109. BOZENSZAJN L. A. şi colab.: Immunol. 1977; 32: 319.
110. SCHAEFER R. M. şi colab.: Dtsch. med. Wochenschr. 1988; 113: 125.
111. SCHNENING F. G. şi colab.: Blood 1993; 81: 20.
112. SCHWAMBORN J. S. şi colab.: Blut 1988; 56: 107.
113. SHEPARD K. M. şi colab.: Clin. Lab. Haematol. 1991; 13: 25.
114. SIMMONS P. J., TOROK-STORB B.: Blood 1991; 78: 55.
115. STARNES H. F.: Semin. Hematol. 1991; 28: 34.
116. STENKE L.: Blood 1993; 81: 352.
117. SUTHERLAND G. R. şi colab.: Blood 1988; 71: 1150.
118. TAVASSOLI M., HARDY C.: Blood 1990; 76: 1059.
119. THOMAS N. D. şi colab.: J. Lab. Clin. Med. 1965; 66: 64.
120. TIL J. E., McCULLOCH E. A.: Radiat. Res. 1961; 14: 213.
121. TORETSKY J. A., SHAHIDI N. T., FINLAY J. L.: Exp. Hematol. 1986; 14: 182.
122. TOROK-STORB B., SIMMONS P., PRZEPIORKA D.: Transplant. Proc. 1987; 19: 33.
123. VAN DEN HEUVEL R. L. şi colab.: Br. J. Haematol. 1987; 66: 15.
124. WHETTON A. D., DEXTER T. M.: Trends Biochem. Sci. 1986; 11: 207.
125. ZAULI G., WALVASSONI L., CAPITANI S.: Blood 1993; 81: 385.
125a. ZURAWSKI G., DE VRIES E. J.: Immunol. Today 1994; 19.
126. ZUCKER-FRANKLIN D., GRUSKY G., L'ESPÉRANCE P.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1974; 71: 711.
127. YOFFEY J. M.: Haematopoietic stem cells, CIBA Found. Symposium, Assoc. Sci. Publ., Amsterdam, 1973.
128. YOFFEY J. M.: Exp. Hematol. 1987; 15: 110.

III

SERIA ERITROCITARĂ

AL. VĂLCU

Sângele este un țesut format din elemente celulare suspendate în plasmă. Raportul dintre elementele suspendate (elemente figurate) și plasmă este de circa 40 : 60 (hematocrit 40%). Masa eritrocitară constituie circa 99% față de masa leucotrombocitară, de numai 1%. Elementele figurate ale sângelui circulant reprezintă o parte a țesutului sanguin: componenta finită. Înainte de a se ajunge la acest stadiu de maturare, eritrocitele și celelalte elemente figurate sanguine trec prin anumite etape celulare de dezvoltare (planșa I).

Eritronul reprezintă o concepție morfofuncțională care include totalitatea elementelor masei eritrocitare. Ansamblul etapelor prin care trece eritrocitul, de la celula pluripotentă până la eritrocitul îmbătrânit și eliminarea lui din circulație, a primit denumirea de eritron. Eritronul are deci 3 compartimente distincte, deși intricate între ele:

— elementele imature (sau fixe), care formează eritropoieza: nașterea eritrocitelor;

— eritrocitele circulante împreună cu cele care stagnează în sinusurile sanguine, cu rol funcțional în transportul oxigenului (viața eritrocitelor);

— retragerea din circulație a eritrocitelor uzate (hemoliza) și recuperarea materialelor din care sunt alcătuite (catabolismul eritrocitar): moartea eritrocitelor.

ERITROPOIEZA

Eritropoieza include, pe de o parte, proliferarea (înmulțirea) și diferențierea (maturarea) precursorilor eritrocitari, împreună cu biosintezele lor specifice (în principal hemoglobina), iar, pe de altă parte, procesul de trecere în circulație a eritrocitelor apte pentru funcția de transport

a oxigenului (diabaza), precum și a factorilor care reglează aceste procese (5, 8).

1. **Celula stem și reglarea eritropoiezei.** Măduva osoasă conține o multitudine de celule, din care doar 1—5% sunt dotate cu calități ce le permit să genereze orice linie celulară din sistemul meduloosos și con-

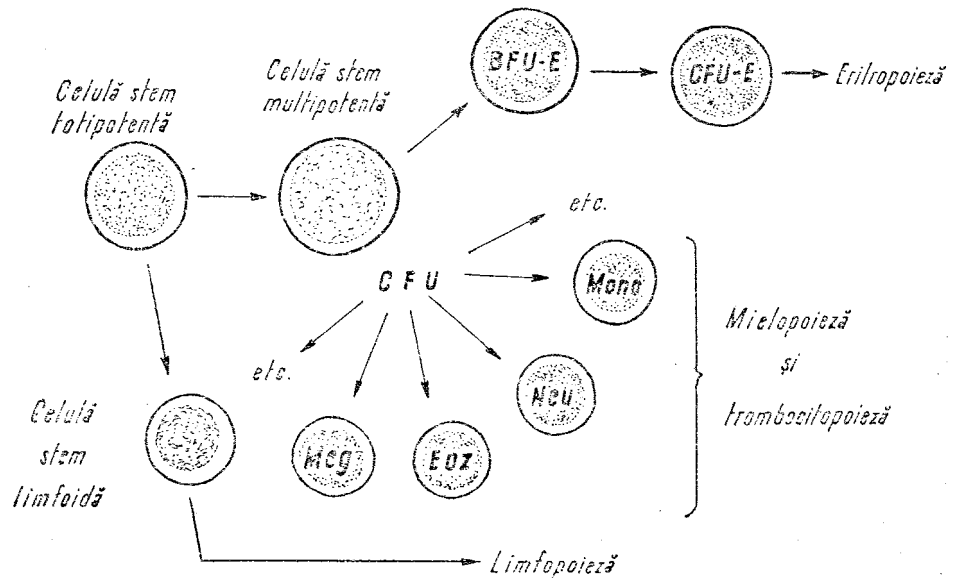


Fig. III.1. — Secvențele primelor faze ale hematopoiezei.
Din grupul celulelor stem totipotente se desprinde sectorul celulelor stem multipotente și al celulelor stem limfoide. Din celulele stem multipotente se desprind celulele eritroide (CFU-E) și cele ale mielopoiezei (CFU) din care derivă CFU-Neu, CFU-Eoz, CFU-Mono, CFU-Meg etc. Precursorul BFU-E *(Burst Forming Unit-E)* este sub controlul factorilor de creștere derivați din limfocite și macrofage, pe când etapa următoare, CFU-E *(Colony Forming Unit)* intră sub controlul hormonului eritropoietină (după R. Hillman și C. Finch, 1985).

junctiv. Această celulă nu poate fi deosebită morfologic de un limfocit mic. Celula multipotentă este prima celulă în secvența etapelor generării și maturării tuturor celulelor medulare. Pentru eritropoieză, separarea începe din etapa următoare: BFU_E *(Erythroid Burst-Forming-Unit)*, respectiv CFU_E *(Erythroid Colony Forming Unit)* care, pusă într-un mediu de cultură, poate produce peste 1 000 de celule eritroide E-CFU (fig. III.1).

Factorii de creștere ai hematopoiezei (citokine). Celulele stem au capacitatea de transformare, la comanda lansată de substanțe secretate de alte celule care răspund solicitărilor locale sau generale ale organismului. Comanda startului și a direcției de evoluție este dată de anumite substanțe, numite citokine. Alteori, proliferările și sintezele sunt induse de funcționarea unor mecanisme de autocontrol, numite *feedback* sau stimulare (respectiv inhibiție), dictate cantitativ de produsul final (autoreglare asemănătoare termocuplurilor din tehnica utilitară) (2).

Celula stem ținută în incubator formează colonii (CFU) iar, în funcție de stimulul primit din partea citokinei secretate, celula stem devine CFU_S (prim-precursor de serie eritrocitară), G-CFU (precursor granulocitar), F-CFU (pentru fibroblast-fibrocit) etc. Odată plecată din start, celula stem își pierde treptat capacitatea de a se mai putea întoarce de la direcția spre care a fost dirijată, diferențierea și proliferarea spre liniile celulare următoare făcându-se sub influența factorilor de creștere. Pentru simplificare, s-a stabilit, convențional, ca aceștia să poarte, la început, majuscula liniilor celulare pe care le stimulează. Există o multitudine de astfel de factori, dintre care unii au fost izolați și intrați în uzul clinic ca mijloace valoroase terapeutice.

Reglarea eritropoiezei. Stimularea eritropoiezei este asigurată de *eritropoietina.* Aceasta se găsește în plasmă și se elimină prin urină. Chimic este o glicoproteină cu o greutate moleculară de 39 000 de daltoni și a cărei activitate biologică rezidă într-un lanț polipeptidic compus din 166 de aminoacizi. Este sintetizată, în proporție de 90%, la nivelul rinichiului, sub formă de proeritropoietină (în celulele interstițiale și cele endoteliale ale capilarelor din corticală) și a fost codificată sub inițialele REF *(Renal Erythropoetic Factor).* Rinichiul este probabil principalul sensor al stării de oxigenare tisulară la adulți. Gena de sinteză a eritropoietinei a fost clonată și este localizată pe cromosomul 7. Aceasta este activată de un alt factor plasmatic de origine hepatică. Hipoxia tisulară este factorul de stimulare a sintezei de eritropoietină. Acțiunea ei în organism este multiplă: stimulează proliferarea de CFU_E și, prin aceasta, diferențierea precursorilor eritrocitari în precursori morfologic diferențiabili (normoblaști), scurtează timpul de maturare și de tranzit medular al precursorilor eritroizi și activează diabaza, efectul ei final fiind creșterea masei de eritrocite circulante. Rata eritropoiezei este comandată de capacitatea de transport al oxigenului la țesuturi. Când transportul oxigenului scade, eritropoieza crește prin mecanism de *feedback,* ce asigură echilibrul dintre eritropoieza medulară și nevoile țesuturilor (2). Producția de eritropoietină scade în hiperoxie, în reducerea masei funcționale renale și în excesul de volum de eritrocite.

2. **Funcțiile medulare.** Între celula stem multipotentă și celulele stem angajate în eritropoieză există o cale de aproximativ 5 diviziuni celulare. Celulele precursoare, deși capabile de a evolua sub acțiunea eritropoietinei, nu sunt încă apte să sintetizeze hemoglobina.

Precursorii celulelor sanguine manifestă, în cursul vieții lor, două tendințe care se intrică: tendința la diviziune, care duce la înmulțirea seriei respective și tendința la diferențiere sau maturare, care asigură suportul activității funcționale a seriei. Formarea celulelor sanguine include trei funcții de bază cuplate ale măduvei osoase: multiplicarea, maturarea și diabaza.

a) *Multiplicarea și maturarea precursorilor eritrocitari.* Un proeritroblast ajunge proeritrocit (reticulocit) în aproximativ o săptămână. În prima fază, care durează circa 4 zile, multiplicarea și maturarea evoluează paralel (fig. III.2).

În faza a doua se realizează exclusiv maturarea, dar fără diviziune a precursorilor eritrocitari. Aceasta este o fază mai avansată de dez-

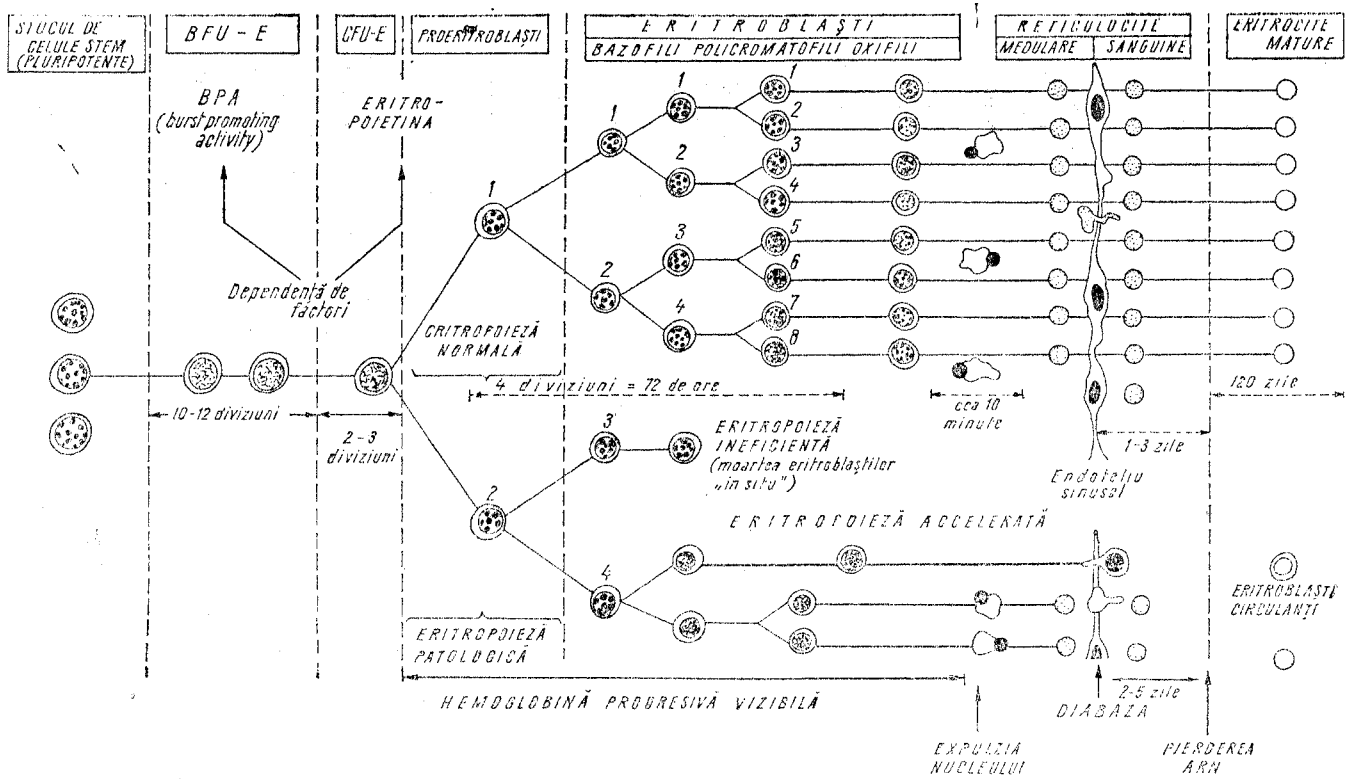


Fig. III.2. — Proliferarea şi maturarea precursorilor eritrocitari.

Celula cap de serie a seriei roşii, proeritroblastul, prima care poate fi individualizată pe frotiul de măduvă osoasă, traversează două etape. În prima etapă diviziunea este dublată de maturare; aceasta necesită circa 4 zile, timp în care se produc 4—5 diviziuni (minimum 3 şi maximum 6) din care rezultă 4 generaţii de celule fiice ($E_2 \rightarrow E_5$): eritroblaşti bazofili (E_2 şi E_3), eritroblaşti policromatofili tineri (E_4) şi eritroblaşti policromatofili avansaţi în vârstă (E_5), incapabili de diviziune. Între mitoze (care durează circa o oră) se interpun pauze intermitotice de 18—26 de ore (mai scurte la celulele tinere). De la ultima mitoză până la reticulocitul circulant se mai adaugă circa 3 zile. Întregul ciclu durează circa o săptămână (modificat după Winrobe şi Zucker-Frank lin şi colab., 1988).

voltare celulară. Pentru seria roșie ea cuprinde eritroblaști policromatofili evoluați, incapabili de înmulțire (din cauza conținutului scăzut în acizi nucleici), eritroblaști oxifili și reticulocite. Această etapă necesită, în continuare, încă circa 3 zile. În mod normal, maturarea nucleului se desfășoară paralel cu maturarea citoplasmei: o citoplasmă tânără coexistă cu un nucleu tânăr, iar unei citoplasme mature îi corespunde un nucleu cu o funcționalitate redusă sau nulă. În diferite stări patologice, *sincronismul de maturare nucleocitoplasmatică* se poate deregla fie în favoarea nucleului, fie a citoplasmei. Asincronismul evolutiv nucleocitoplasmatic poate să apară în toate anemiile grave.

Diviziunile care se produc în mod fiziologic în progresie geometrică nu ajung în totalitate la cifra 8 (în cazul în care s-au produs 4 mitoze) ci, în stările fiziologice, în care nu sunt solicitări suplimentare pentru eritropoieză, un procent variabil din eritroblaști moare în măduvă (eritropoieză ineficientă fiziologică).

b) *Expulzarea nucleului.* Fenomenul care eliberează eritroblastul oxifil de nucleu este expulzia nucleară. Aceasta este precedată de condensarea agregatelor cromatiniene (picnoză). Microcinematografia a evidențiat că acesta, devenit suficient de matur pentru expulzare, prezintă, la un moment dat, mișcări foarte ample, cu deformări petaloide ale conturului celular, după care urmează expulzarea nucleului aflat în una din excrescențele citoplasmatice (fig. 3.3 B). Expulzarea propriu-zisă durează circa 10 minute. Celulele macrofage (care „alimentează" ca o doică eritroblaștii grupați în jurul lor, realizând un „cuib" de eritroblaști) fagocitează nucleii liberi de eritroblaști oxifili, curând după expulzarea lor. Între macrofage și precursorii eritrocitari există o interdependență cu un schimb activ de substanțe: pe de o parte macrofagele „aspiră" din eritroblaști, prin pinocitoză, anumiți produși reziduali (depășiți metabolic în respectivul moment de dezvoltare), iar, pe de altă parte, eritroblaștii preiau de la macrofage (pentru grăbirea maturării lor) substanțe pe care macrofagul le-a prelucrat enzimatic de la alte celule, anterior fagocitate (fig. III.3 A).

c) *Diabaza.* Trecerea reticulocitelor din măduvă în circulație se face prin mișcări active, asemănătoare procesului de diapedeză leucocitară. Prin microcinematografie s-a putut observa cum reticulocitul emite un pseudopod pe care-l împinge între două celule endoteliale, această prelungire devenind din ce în ce mai voluminoasă, până cuprinde întreaga masă a celulei, după care reticulocitul, intrat în curentul circulator, își reia forma obișnuită. În cazuri patologice, diabaza poate fi tulburată fie prin blocarea exagerată a celulelor *in situ*, fie prin trecerea unor celule imature în circulație. În toate cazurile în care măduva este solicitată să producă mai multe eritrocite, pe frotiul sanguin se constată o creștere a precursorilor eritrocitari care sunt cu atât mai tineri, cu cât solicitarea este mai mare (diabază prematură) (fig. II.3 C-D).

3. **Precursorii eritrocitari.** *Morfologia precursorilor eritrocitari.* Terminologia creată de autori aparținând unor etape și școli diferite, pe lângă că a dus la progrese în morfofiziologia cunoașterii elementelor, a creat, implicit, și unele confuzii, aceluiași element fiindu-i atribuite sensuri și interpretări variate. În vederea uniformizării s-a creat un co-

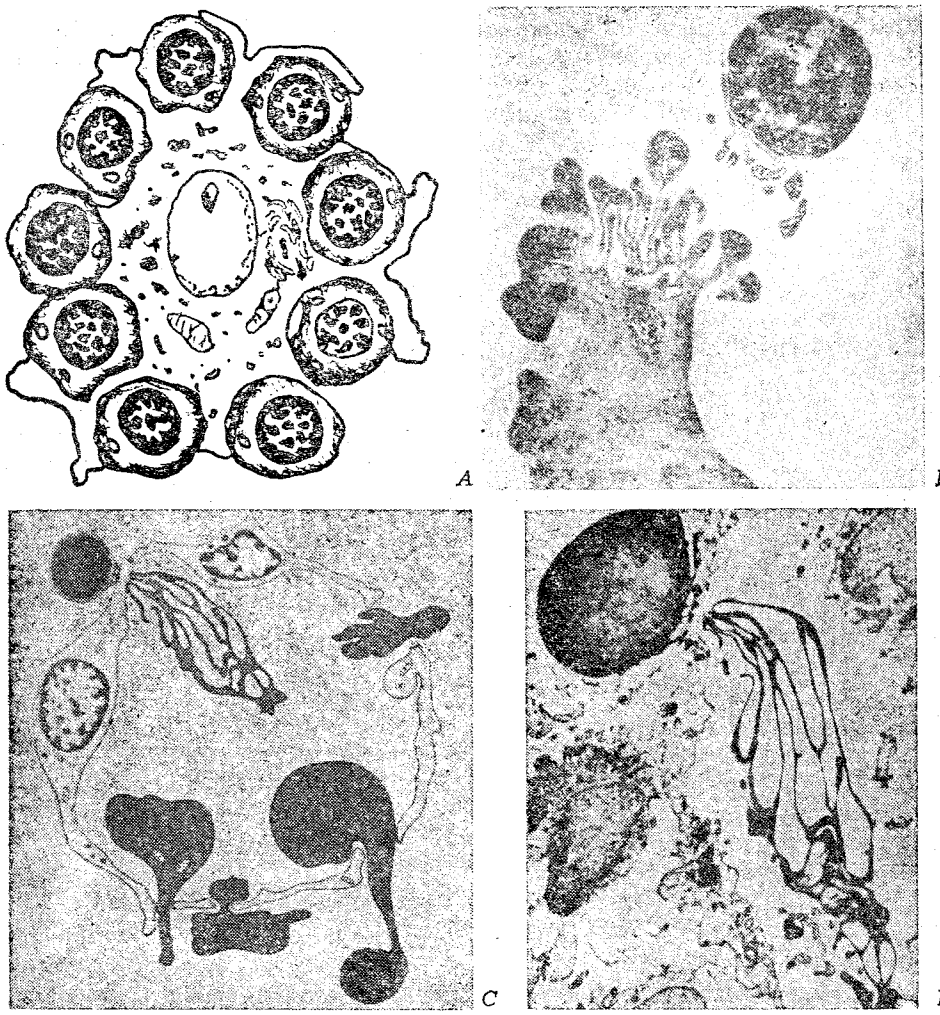


Fig. III.3. — A. Celulă macrofagă înconjurată de eritroblaşti (‚celulă doică"); B. Expulzia nucleului dintr-un eritroblast; C. Secţiune printr-un sinus medular cu trecerea în circulaţie a reticulocitelor; D. Detaliu (sus-stânga) din imaginea C (montaj fotografic după M. Bessis).

A. Cuib de eritroblaşti: coabitare între celula macrofagă — (care s-a încărcat cu „produşi alimentari" după digestia unor eritrocite nefuncţionale şi nuclei expulzaţi) — şi eritroblaşti oxifili şi policromatofili care se hrănesc direct, prin pinocitoză, de la celula doică care, astfel, se împrospătează pentru a putea purifica, în continuare, sângele şi ţesuturile de deşeuri.

B. Eritroblast devenit reticulocit după expulzia nucleului. De remarcat în interiorul reticulocitului o abundenţă de organite citoplasmatice şi material de bază necesar pentru perioada de trecere spre eritrocit (desăvârşirea încărcării cu hemoglobină).

C. Capilar sinusal de măduvă osoasă (secţiune transversală) în care sunt în curs de diapedeză 5 elemente: 3 reticulocite şi 2 eritroblaşti oxifili; ultimii, concomitent cu traversarea, îşi expulzează şi nucleul. De remarcat mişcările active ale acestora în cursul traversării peretelui endotelial.

D. Detaliu de pe aceeaşi fotografie (stânga-sus).

mitet pentru clarificarea nomenclaturii celulelor și bolilor sângelui și organelor formatoare ale sângelui. Acesta a recomandat o terminologie unitară, pe care o folosim în paralel și pentru seria eritrocitară (7).

a) *Proeritroblastul* este primul precursor eritrocitar medular cu morfologie individualizată. El prezintă caracteristicile celulei tinere, ceea ce îl apropie de celelalte celule cap de serie cu care se aseamănă uneori (mieloblast, limfoblast etc.) și de care nu este totdeauna ușor de diferențiat. Prefixul „pro" este neadecvat, întrucât îl situează, pe nedrept, înaintea echivalentelor sale din celelalte linii celulare sanguine; de aceea, comitetul pentru uniformizarea nomenclaturii a propus denumirea de *pronormoblast* sau rubiblast de stadiul I de dezvoltare. Talia pronormoblastului este mare, între 18 și 25 μm. Conturul este rotund, bine delimitat, uneori cu o mică buclă citoplasmatică (ca o vâslă ce ar ajuta la deplasările ameboide). Nucleul este rotund, voluminos, ocupă circa 8/10 din suprafața totală a celulei și are o poziție ușor excentrică. Cromatina este colorată violet purpuriu; bazicromatina și oxicromatina sunt dispuse în rețea fin împletită, dând nucleului un aspect perlat. Nucleolii sunt în număr redus (1 sau 2), mai puțin conturați și dispar rapid în cursul maturației. Citoplasma, îngustă și intens bazofilă la periferie, prezintă în jurul nucleului o zonă clară cromofobă (halou perinuclear). Citoplasma este bogată în poliribosomi și este activ implicată în sinteze proteice (mai ales în sinteza Hb); aparatul Golgi și mitocondriile sunt în număr mare.

Frecvența proeritroblaștilor în mielogramă este de 0,5—1,5% din elementele seriei roșii. Proeritroblastul trebuie deosebit de mieloblast, care are o structură nucleară mai fină (dantelată), cu nucleoli mai numeroși și mai evidenți; citoplasma acestuia este mai abundentă, de culoare albastră, mai puțin intensă și cu halou perinuclear mai discret. În cazurile în care citoplasma conține câteva granulații azurofile, se exclude apartenența la seria roșie.

Pronormoblastul conține, în citoplasma perinucleară, fosfatază acidă, care scade continuu în cursul maturării, ajungând abia decelabilă în eritroblastul policromatofil.

b) *Grupul normoblaștilor.* Caracteristicile precursorilor eritrocitari, ca și ale tuturor seriilor sanguine, sunt într-o continuă schimbare, dictată de apropierea lor de maturare: încărcare progresivă cu hemoglobină a citoplasmei, diminuare a taliei celulare, nucleul scade ca volum, iar cromatina — fină inițial — se densifică, pentru a deveni picnotică, după care urmează expulzarea nucleului. Aspectele morfologice ale anumitor prototipuri celulare sunt instantanee evolutive. În practică, o parte din precursorii eritrocitari se găsesc într-un stadiu intermediar pe care morfologul îl încadrează arbitrar într-un anumit tip celular.

Normoblastul bazofil (prorubicitul sau rubiblast de stadiu II de dezvoltare). Talia celulei descrește la 12—18 μm. Pe frotiul de măduvă pot fi observate prelungiri citoplasmatice de alt gen decât la pronormoblast, sub formă de punte ce unește câte doi eritroblești de aceeași vârstă (bazofili sau policromatofili) situați, uneori, la distanță apreciabilă, rezultat al citodierezei (ultima etapă a telofazei). Raportul nucleocitoplasmatic este de aproximativ 3/4. Nucleul, lipsit de nucleoli, ră-

mâne sferic, situat central; cromatina este dispusă în grămezi dense și neregulate, colorate în violet negricios. Citoplasma rămâne intens bazofilă (este cea mai albastră celulă de pe frotiu). Zona cromofobă perinucleară este mai puțin evidentă. Uneori se observă, în plină citoplasmă, mici puncte incolore (aspect de „picățele"), considerate imagini „în negativ" ale mitocondriilor. Frecvența sa pe frotiul medular este, în medie, de 16 (între 10 și 25) la 100 de elemente ale seriei roșii. Normoblastul bazofil poate fi, uneori, confundat cu un plasmocit care are însă cromatina nucleară dispusă în spițe de roată. El prezintă frecvent vacuole, iar cromatina nucleară apare fărâmițată, sub forma de „bulgări" mai puțin numeroși decât la plasmocit.

Normoblastul (eritroblastul) policromatofil prezintă cele mai mari variații morfologice din seria roșie, de la forme apropiate normoblastului bazofil, până la forme apropiate de cel oxifil. Talia celulei descrește și mai mult (10—12 μm); forma rămâne rotundă (ca de altfel pentru toate elementele seriei roșii). Nucleul rotund se reduce din ce în ce mai mult și este dispus excentric, ocupând circa 50% din celulă. Raportul nucleu/citoplasmă se modifică în avantajul citoplasmei. Structura cromatinei nucleare este mai condensată, iar blocurile ce se formează îi dau, uneori, un aspect de „spițe de roată", dar nu atât de net ca la plasmocit. Citoplasma are un aspect caracteristic: mai bazofilă la periferie, capătă, spre nucleu, o tentă verde-bronzată, apoi portocalie. Frecvența sa este de circa 50% din totalul eritroblaștilor. În cazuri rare, normoblaștii policromatofili patologici (microblaști) pot fi confundați cu limfocitele mijlocii. În cazuri de supracolorare pot mima aspectul limfocitelor mici.

Normoblastul oxifil sau ortocromatic (metarubicit sau rubicit de stadiu IV) este cel mai ușor de identificat, având, aproximativ, aspectul unui eritrocit cu nucleu prezent. Este o celulă rotundă sau ușor ovală, cu diametrul de 8—10 μm. Nucleul se reduce din ce în ce, ocupând circa 1/4 din suprafața celulei, pierzând progresiv structura cromatiniană pentru ca, în cele din urmă, să devină picnotic. În cazuri patologice, nucleul poate să apară sub forme bizare (de cocardă, treflă), aspecte întâlnite frecvent în boala Biermer. Citoplasma este oxifilă, asemănătoare cu a eritrocitelor, însă cu o tentă discret policromatofilă. Frecvența pe frotiu este, în medie, de 32% (între 30 și 35%) din totalul precursorilor eritrocitari (fig. III.4).

Morfologia precursorilor eritrocitari la colorații speciale. a) *Sideroblaștii medulari.* În anumite stări patologice, ca anemiile feriprive, sideroblastice, talasemii, hemocromatoze etc., colorarea frotiului pentru evidențierea granulelor de fier este de o importanță diagnostică majoră.

Sideroblaștii medulari sunt eritroblaști de diferite vârste, care conțin granule de fier neheminic, numite *siderosomi.* Aceste granule se pun în evidență cu ajutorul coloratiei Perls (albastru de Berlin). Ele pot apărea în cantitate, fie normală fie crescută, în eritroblaști, în celulele macrofage și, mai rar, în eritrocite, dar pot să și lipsească. *Siderocitele* sunt eritrocite (în mod normal reticulocite) ce conțin granule de fier nelegat de hemoglobină. Sideroblaștii normali conțin siderosomi sub

formă de granule fine de culoare verde închis, în număr redus (1—4, rareori mai multe), de dimensiuni mici (0,2—0,4 μm); granulele sunt rotunde și răspândite neregulat în citoplasmă. La subiectul sănătos, numărul sideroblaștilor variază între 10 și 60%, în medie 30%, din totalul eritroblaștilor.

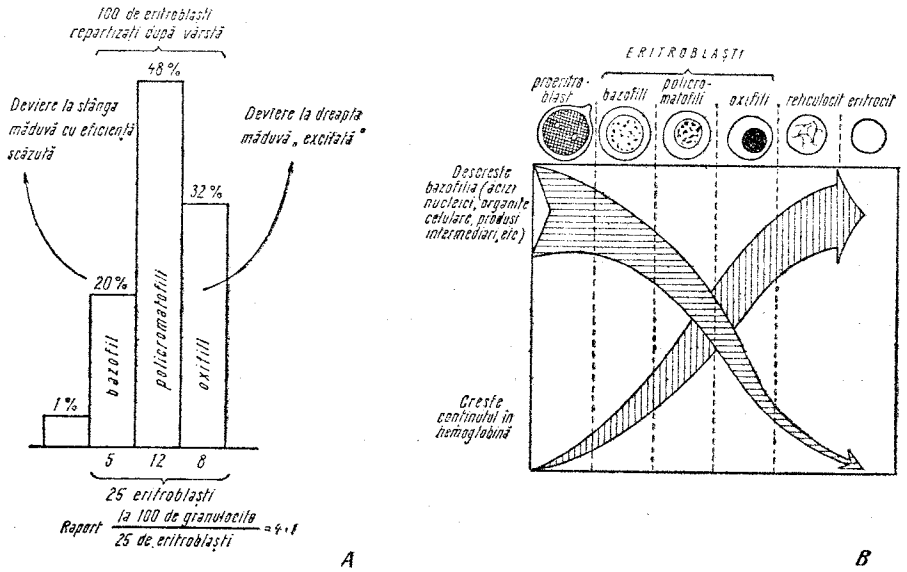


Fig. III.4. — A. Curba de maturare normală a seriei roșii și cele două tendințe de deviere eritroblastică. B. Tendințele precursorilor eritrocitari față de încărcarea cu hemoglobină și „debarasarea" de bazofilia citoplasmatică.

b) *Reticulocitele* sau *proeritrocitele* se găsesc atât în măduvă, cât și în sângele periferic. Ele sunt în proporție de circa 1% din eritrocite, cu variații între 0,5 și 2%. Numărul reticulocitelor din măduvă este de 3—4 ori mai mare decât în periferie, dar evidențierea lor nu este necesară decât în sângele periferic. Ele sunt eritrocite imature, care circulă în sânge 1—3 zile, timp în care își desăvârșesc maturarea. Denumirea de reticulocite provine de la rețeaua reticulofilamentoasă ce se observă în interiorul lor, la colorația supravitală cu albastru de crezil briliant. Această rețea este alcătuită din organite citoplasmice restante, ca și din ribonucleoproteine care precipită sub efectul colorantului. Acest supliment de materie vie față de eritrocit conferă reticulocitelor dimensiuni mai mari (9—10 μm) și un volum de peste 150 μm^3. După maturare, rețeaua granulofilamentoasă dispare printr-un mecanism în care macrofagele au rolul principal. În anumite tipuri de anemii, ca cele hemolitice și cele hiposideremice, reticulocitele stagnează mai puțin în măduva osoasă, dar persistă mai mult în circulația sanguină (48—72 de ore), de aceea interpretarea trebuie făcută cu corectivul respectiv. În cazurile în care se instalează o anemie bruscă, de exemplu după o sângerare masivă, se produce o descărcare prematură de reticulocite din măduvă.

Odată cu această tendință de recuperare a pierderilor sanguine, traversează barierele sinusale și eritroblaști aflați în stadii avansate de maturare. Reticulocitele prematur eliberate necesită și aici un timp mai îndelung de maturare în circulația sanguină decât cele ajunse pe cale normală (de la o zi la 3 zile).

Se cunoaște influența splenectomiei asupra creșterii numărului de reticulocite. Prezența elementelor citoplasmatice amintite, a acizilor nucleici și a altor substanțe conferă reticulocitelor, cu toată lipsa nucleului, o activitate metabolică mult crescută față de aceea a eritrocitelor. Ele au acțiuni multiple: continuă sinteza hemoglobinei până la saturarea eritrocitului, conferă celulei o activitate „respiratorie" (ciclul Krebs), care lipsește în eritrocite, permit celulelor mișcări de diapedeză, cu ajutorul cărora acestea pot trece din spațiul medular în sinusurile sanguine etc. (vezi fig. III.3 C și D).

Determinarea numărului de reticulocite în sângele periferic are o valoare semiologică deosebită, fiind indispensabilă în toate formele de anemii. Numărul de reticulocite reflectă eficiența activității proliferative a măduvei, creșterile putând avea fie o valoare prognostică favorabilă (de exemplu, în tratamentul anemiilor aregenerative), fie o valoare diagnostică (de exemplu, în tratamentul anemiilor hemolitice). Scăderea numărului de reticulocite traduce o insuficiență a măduvei osoase în producția de eritrocite. Ea se întâlnește în aplazia medulară de orice cauză, în blocajul de maturație a eritroblaștilor, în transformarea sau invazia malignă a măduvei (hemopatii, cancere etc.). Reticulocitoza are valoare practică mai mare decât reticulocitopenia, de exemplu, în insuficiențele medulare. Reticulocitopenia este mai precoce decât granulocitopenia în boala de iradiere (ambele apărând rapid); reapariția reticulocitelor după iradiere este un indiciu de repopulare medulară, în timp ce reticulocitopenia tardivă este un semn de prognostic nefavorabil. Creșterea numărului de reticulocite traduce o hiperactivitate medulară eficientă, urmărirea periodică a cifrei reticulocitare fiind de mare utilitate. O reticulocitoză este întâlnită în anemiile hemolitice cu măduvă hiperplazică eficientă, în stările consecutive hemoragiilor, în tratamentul eficace al anemiilor carențiale (megaloblastice, sideropenice etc.), când se realizează criza reticulocitară. În anemiile megaloblastice, răspunsul eficace al tratamentului cu vitamina B_{12} este spectacular, procentul de reticulocite poate crește de la 0,1—0,2% la 20—30%, iar cifra absolută de la 20 000 la 200 000—700 000/mm^3, în 3—4 zile de tratament.

Producția de reticulocite se măsoară cel mai bine cantitativ, prin determinarea indicelui reticulocitar în care se utilizează hematocritul raportat la numărul de reticulocite după formula:

$$\text{Indice reticulocitar} = \text{reticulocite în\%} \times \frac{\text{hematocritul pacientului}}{\text{hematocritul normal}} \quad (N = 1{,}5—2)$$

Numărul de reticulocite pe microlitru se poate determina după formula: reticulocite%×nr. hematii (de exemplu: 0,01×5 000 000= 50 000). Limita normală superioară este 100 000/microlitru.

TABELUL 3.I

Răspunsul reticulocitelor în funcție de severitatea anemiei în cazurile în care măduva osoasă își păstrează o bună funcționalitate
(după W. Beck, 1991)

Hematocrit	45	40	35	30	25	20	20
Hemoglobină	15,0	13,3	11,7	10,0	8,3	6,6	5,5
Reticulocite în %	1,0	2,0	5,0	10,0	15,0	20,0	30,0
Indice reticulocitar	1,0	1,3	4,0	7,0	8,3	9,0	10,0

ERITROCITUL

STRUCTURĂ

Membrana eritrocitară. Suprafața eritrocitară este delimitată de membrană. Ea alcătuiește o barieră selectivă la nivelul căreia au loc schimburi între celulă și mediul înconjurător. Membrana rezultă din asocierea și condensarea unor substanțe tensioactive, lipido-glucido-proteice. Între acestea există interacțiuni topochimice reciproce.

Un important progres în cunoașterea membranei eritrocitare a putut fi realizat prin obținerea stromelor sau a „fantomelor" eritrocitare care au servit de model pentru înțelegerea structurii și a altor membrane decât a celei eritrocitare. Acestea au rezultat după golirea eritrocitelor de conținutul lor, după care membrana a putut fi mai bine analizată prin separarea ei în componentele din care este alcătuită. Membrana eritrocitară este asemănătoare ca structură și funcționalitate cu membranele altor celule (leucocite, celule nervoase, renale) și chiar cu membranele unor organite citoplasmatice. Ea putând fi mai bine manipulată pentru cercetare, a servit ca model de studiu.

Membrana eritrocitară conține circa 52% proteine, 40% lipide și 8% hidrați de carbon (asociați cu proteinele). Ea este alcătuită din 3 straturi care, împreună, alcătuiesc un complex unitar. Modelul unanim acceptat pentru mebrana eritrocitară este unul schematic alcătuit din 3 straturi paralele: un strat mijlociu cu o grosime de circa 35 Å, electronotransparent, flancat de 2 straturi electronooptice — superficial și intern — de circa 20 Å fiecare. Date noi au îmbogățit această imagine schematică a membranei.

Matricea mijlocie lipidică este alcătuită din două trame asimetrice: cea externă în care predomină colina (fosfatidil colina plus sfingomielina) și cea internă, în care predomină aminele (fosfatidil serina și fosfatidil etanolamina). Membrana lipidică include unele componente care își păstrează strict proporțiile între moleculele de colesterol și cele fosfolipidice. Un singur eritrocit conține $1,9 \times 10^8$ molecule de colesterol și $2,4 \times 10^8$ fosfolipide. Aceste structuri ancorează la suprafață molecule de zaharuri în proporție de $1,2 \times 10^7$, iar pe de altă parte sunt străbătute de numeroase molecule proteice, numite proteine integrate, din care unele sunt adevărate canale de transport, ca glicoforinele A, B și C,

proteinele benzii 3 etc. Stratul lipidic este foarte mobil și se ondulează asemenea unui strat de petrol la suprafața valurilor, ceea ce contribuie ca membrana eritrocitară să posede o pronunțată suplețe și deformabilitate, în schimb nu prezintă o rezistență suficientă.

Stratul superficial. Evoluția organismelor multicelulare a dus la pierderea autonomiei celulelor specializate. Pentru aceasta ele și-au creat, pe membrană, receptori de percepere a semnalelor provenite de la alte celule (prin intermediul secrețiilor acestora), structuri care contribuie la menținerea homeostaziei întregului organism. În funcție de celelalte celule, eritronul și-a adaptat funcțiile (de inhibiție sau de inducere a expresiei) la programul genetic de integrare în unitatea funcțională a organismului (7). În consecință, stratul superficial nu este nici el independent. El este un adevărat mozaic structural ce conține o mare varietate antigenică. Pe el sunt situate antigenele grupelor și subgrupelor sanguine, în număr de peste 300 de tipuri, care au putut fi recunoscute prin determinanți antigenici specifici. Acești determinanți nu sunt dați numai de lanțurile de hidrați de carbon, ci de combinația lor cu prelungiri de lanțuri peptidice. Proteina benzii 3 conține majoritatea determinanților pentru sistemul Rh. Pe membrană sunt situați și receptori pentru virusuri, paraziți, lectine vegetale etc. Structurile antigenice pot fi independente unele de altele, dar pot fi și asociate, de exemplu, antigenul de grup A este comun pentru receptorul *Dolichos biflorus,* sau antigenul de grup sanguin Duffi cu al plasmodiului, între acestea existând interacțiuni topochimice reciproce. Polizaharidele superficiale joacă și un rol în recunoașterea celulară și adezivitate (2, 38).

• **Eritrocitul circulant.** *Mediul circulant al eritrocitului.* Sângele este un țesut format din elemente celulare suspendate în plasmă. El nu este un lichid izolat care circulă într-un sistem închis de conducte de diferite calibre, ci reprezintă o parte din mediul intern care hrănește toate celulele organismului. Individul adult deține circa 5 l de sânge, din care 2 l reprezintă masa eritrocitară, respectiv 750 g de hemoglobină. Rata de pierdere/reînnoire este de circa 1% pe zi (echivalentul aproximativ al procentului de reticulocite de pe frotiu).

• **Eritrocitul normal.** Eritrocitele sunt celulele cele mai simple din organism. Funcția lor principală este restrânsă la protecția hemoglobinei și la transportul, prin intermediul acestui pigment, a oxigenului atmosferic la țesuturi și, în sens invers, a bioxidului de carbon. Deși lipsite de nucleu și de organite citoplasmatice, aceste elemente sunt totuși celule, dar cu o activitate mai restrânsă, ultraspecializate funcției pe care trebuie să o îndeplinească timp de 4 luni în circulația sanguină.

Stratul intern, suportul sau scheletul membranei, este alcătuit dintr-o rețea, asemănătoare unei plase elastice, formată din două tipuri de macromolecule, unele fibrilare, iar altele globuloase. Rețeaua de filamente flexibile se asociază la nivelul nodurilor de îmbinare cu proteinele globuloase, asigurându-se astfel eritrocitului rezistența, forma, deformabilitatea și integritatea pe timpul celor 120 de zile de existență în circulație. Iar pentru a nu fi vulnerabil, eritrocitul trebuie să dispună, în acest interval, de o bună integritate structurală din care derivă și

o bună interacțiune între numeroasele proteine care alcătuiesc scheletul (fig. III.5).

Din numeroasele procedee de studiu care au contribuit cel mai mult la lămurirea arhitecturii membranei eritrocitare, metoda electroforetică cu dodecilsulfat de sodiu în gel de poliacrilamidă (DSS-GPAA) a pus în evidență, în funcție de viteza diferită de migrare a proteinelor,

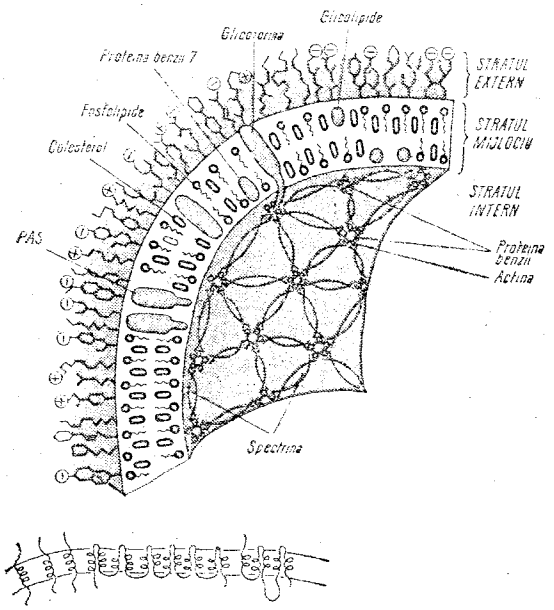


Fig. III.5. — Reprezentare intuitivă a unui eșantion de membrană eritrocitară, decupat transversal, pentru a se pune în evidență cele 3 straturi intricate. Jos sunt redate, tot schematic, proteinele integrate în stratul lipidic.

10—15 benzi care corespund proteinelor majore de structură, dar există și alte circa 200 de proteine minore. Numerotarea ca „benzi" a fost făcută în ordinea migrării electroforetice. Prin perfecționarea acestei metode s-au obținut și „subbenzi" (de exemplu: 2.1, 2.2, ... 2.6 sau 4.1a, 4.1b, 4.2, ... 4.9). Unele din proteine au avut sau au primit denumiri proprii (de exemplu, actina, spectrina, anchirina), iar altele așteaptă să fie mai bine individualizate pe baza funcției și structurii lor primare. O parte din „subbenzi" nu reprezintă proteine integre, ci fragmente de lanțuri polipeptidice (fig. III.6, în stânga) (9 a).

Componentele biochimice ale membranei eritrocitare.

Spectrina este cea mai importantă proteină structurală a membranei eritrocitare. Apare pe locurile 1 și 2 ale benzilor de migrare electroforetică și reprezintă circa 75% din proteinele scheletale. Este o proteină fibrilară, flexibilă, cu o lungime de circa 1 000 Å, alcătuită din 2 subunități polipeptidice dispuse în dublu helix: monomeri alfa și beta în autoasociere spiralată, unul cu o greutate medie de 240 000 d și altul de 220 000 d; dimerul spiralat este rezultatul unor interacțiuni necovalente. Dacă cei doi heterodimeri se unesc cap la cap (ca două cabluri electrice în spirală), realizează un tetramer filamentos ($alfa_2$, $beta_2$), cu o greutate moleculară totală de 920 000 d și o lungime de 200 nm. Digestia triptică limitată a permis fragmentarea lanțurilor alfa în 5 segmente, notate în ordine cu numere romane de la I la V, iar a lanțurilor beta în 4 segmente, notate de la I la IV. Fiecare monomer obținut prin digestie fracționată poate fi apoi expus la efectro-

forează bidimensională, realizându-se un număr mare de subunități oligopeptidice, notate cu cifre arabe și cu litere majuscule (după poziția sectorului ce-l ocupă). Acestea se prezintă ca formă, mărime și poziție totdeauna identice pentru același tip de fragment peptidic care poate fi analizat pentru acizi aminați conținuți (10). Segmentele alfa și beta ale monomerilor de spectrină pot fi transferate pe suport de nitroceluloză și incubate cu anticorpi monoclonali pentru identificarea, prin precipitare, a legăturilor imune rezultate.

Numai prin intermediul altor proteine, ca actina (banda 5) și proteina benzii 4.1, dimerii de spectrină pot să se lege în tetrameri. În afara acestei plase, care asigură legăturile orizontale, rețeaua dispune și de interacțiuni verticale, cu straturile supraiacente; proteina astfel integrată, inclusă în dublul strat lipidic (banda 3),

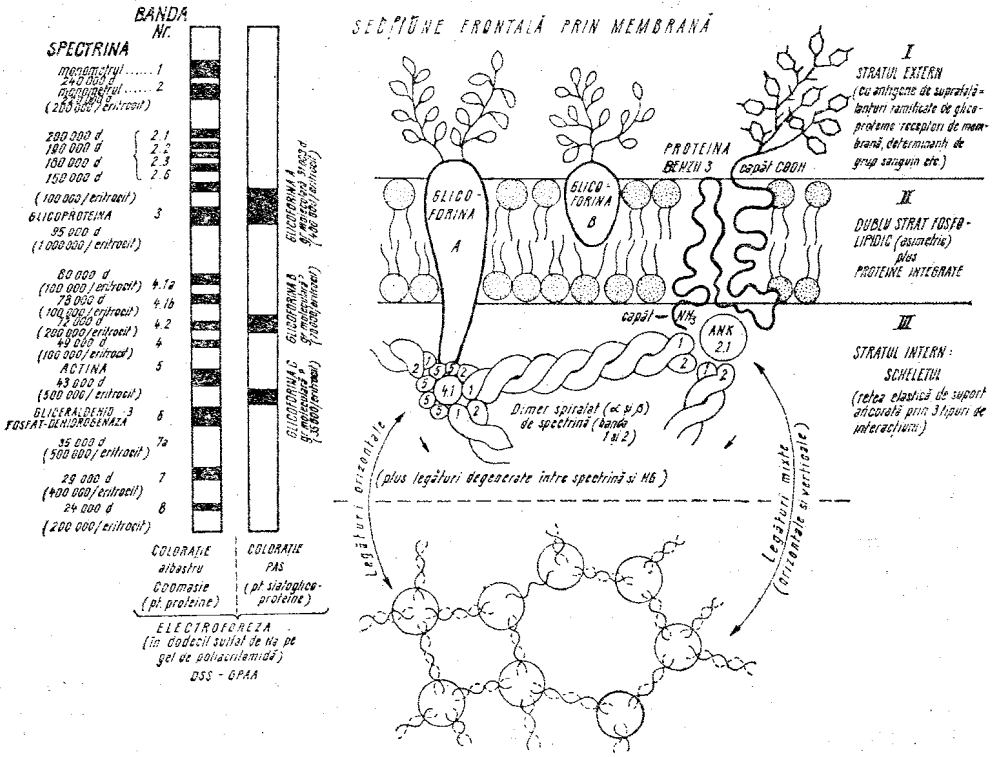


Fig. III.6. — Compoziția, aranjamentul și nomenclatura componentelor moleculare ale celor 3 straturi care alcătuiesc membrana eritrocitară.

Eritrocitele, golite de conținutul lor (devenite „fantome eritrocitare") sunt supuse acțiunii unor detergenți care le separă în mai multe componente. Pe de o parte obținem lipide solubilizate împreună cu proteinele integrate și stratul superficial bogat în acid sialic, iar pe de altă parte obținem o grupare de proteine care constituie stratul subiacent sau scheletul membranei.

În stânga figurii sunt redate două coloane cu benzile rezultate din migrarea acestor componente în dodecilsulfat de sodiu pe gel de poliacrilamidă. Una din benzi este colorată cu albastru Coomasie și evidențiază majoritatea proteinelor, iar cealaltă este colorată cu acid periodic Schiff (PAS) și evidențiază sialo-glicoproteinele. Sub denumirea benzilor sunt redate, în daltoni, greutatea moleculară a proteinelor, iar în paranteză numărul de molecule pe suprafața unui eritrocit.

În dreapta figurii este înfățișat, schematic, modul de organizare a acestor componente în cele 3 straturi, precum și interacțiunile dintre ele (modificate după 21 și 11).

este ancorată prin intermediul anchirinei (banda 2.1) tot la rețeaua de spectrină, realizându-se cel puțin 3 tipuri principale de interacțiuni ale spectrinei (4). Dar, pe lângă interacțiunile ei cu proteinele din schelet (rețeaua orizontală bidimensională) și cu proteinele integrate (legături pe plan vertical), dimerul de spectrină are și legături directe cu stratul lipidic supraiacent, respectiv cu fosfatidil serina și fostfatidil etanolamina. Aceste interacțiuni au rol suplimentar în menținerea stabilității dublului strat lipidic. Slăbirea acestor legături duce la pierderi suplimentare de membrană lipidică (7).

Actina (banda 5) este o proteină fibrilară, elastică, de dimensiuni mici, asemănătoare sau identică cu actina musculară sau trombostenina trombocitară (cu rol în retracția cheagului). Ea reprezintă circa 10% din proteinele scheletului de membrană.

Stoichiometric, la un dimer de spectrină revin 4 filamente de actină. Grupul acestor fine proteine contractile se leagă și de proteinele benzii 4, care strâng dimerii spiralați de spectrină, realizând baza interacțiunilor scheletale pe plan orizontal. Moleculele de spectrină și actină constituie aproape totalitatea proteinelor fibrilare ale scheletului de membrană; celelalte proteine, văzute tridimensional, au o formă plicaturată.

Proteina benzii 4.1 modelează legăturile dintre dimerii de spectrină și scurtele filamente de actină, fixând scheletul de stratul lipidic supraiacent prin intermediul proteinei integrate (banda 3). Ea se găsește în cantitate mare în structura membranei (circa 200 000 de molecule/eritrocit). Pe coloanele de electroforeză, banda 4 apare formată din numeroase straturi (4.1a, 4.1b, 4.2, ... 4.9), unele din acestea putând fi oligomeri ai lanțurilor polipeptidice. Proteinele benzii 4.1 împreună cu actina prezintă un rol cheie în menținerea integrității citoscheletice (4). În boli hemolitice ereditare cu defecte de membrană, ca ovalocitoza, piropoikilocitoza și sferocitoza, deficitul total sau parțial de proteină 4.1 este implicat în tulburări morfologice și durata de viață redusă a eritrocitelor.

Anchirina (proteina benzii 2.1) este o proteină globuloasă de circa 20 nm. Are mai multe puncte de legătură, unele pe plan orizontal, cu dimerul de spectrină cu care se leagă stoichiometric, și altele pe plan vertical, cu proteina benzii 3 cu care interacționează, „ancorând" rețeaua de bază la straturile supraiacente. Pe benzile de migrare electroforetică apare și ea sub mai multe straturi, de la 2.1 la 2.6.

Proteina benzii 3 este o glicoproteină integrată, voluminoasă, ce se prezintă, mai probabil, ca un ansamblu de polipeptide heterogene cu roluri multiple; are o greutate de 100 000 d și se găsește într-o cantitate de circa 100 000 de molecule pe suprafața unui eritrocit. Banda 3 este principala proteină translipidică care face legătura între dublul strat lipidic și scheletul subiacent. Ea conține majoritatea determinanților pentru sistemul Rh și este, spre exterior, receptorul concanovalinei A, a lectinei de *Ricinus communis* etc., având rol atât în permeabilitatea anionilor (sulfați, fosfați), a glucozei, cât și în mișcarea apei.

Membrana eritrocitară mai conține un număr variat de proteine-enzime, al căror rol este doar în parte cunoscut (față de enzimele din interiorul eritrocitului); gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (proteina benzii 6), ATPaza membranei, acetil colinesteraza etc.

Glicoforinele, în număr de 3, devin aparente ca benzi pe DSS-GPAA numai la coloratia PAS. Glicoforina A este prezentă cu 400 000 de molecule pe suprafața unui eritrocit (față de 70 000, respectiv 35 000 pentru celelalte două). Este formată dintr-un singur lanț peptidic alcătuit din 131 de acizi aminați. Capătul N-terminal împreună cu primii 90 de acizi aminați este în exterior; de el sunt legate 16 unități oligozaharidice (60% din masa totală a moleculei). Ele sunt ramificate pe suprafața eritrocitară asemenea unor alge pe o piatră de la suprafața apei. Cele mai numeroase lanțuri ramificate de oligozaharide au la capăt acidul sialic cu încărcare electrică negativă, ceea ce întârzie aglutinarea și sedimentarea eritrocitelor. Acidul sialic descrește odată cu îmbătrânirea eritrocitelor. Glicoforina A poartă antigene ale grupelor sanguine MN, precum și receptori de mixovirusuri și lectine.

Orice defect mutagen sau reacție biochimică patologică slăbește interacțiunile necovalente ale submembranei (a scheletului), ducând la instabilitatea legăturilor și, implicit, la pierderi de fragmente de membrană, descrește suprafeței și a volumului eritrocitar, slăbirea capacității de deformare reversibilă, creșterea capacității de captare splenică și, în cele din urmă, la hemoliză precoce.

Eritrocitul este format în proporție de 60% din apă, 33—35% din hemoglobină și 5—7% din alte substanțe care intră, în cea mai mare parte, în compoziția membranei. Conținutul eritrocitului în apă este intermediar față de cel al altor celule, de exemplu ficatul are o concentrație apoasă de 75%, rinichii de 80%, substanța cenușie a creierului de 85%, pe când sistemul osos conține 25—30%, iar țesutul adipos doar 20% apă.

În această suspensie apoasă se află macromoleculele (hemoglobină, enzime), substanțe organice cu moleculă mică (glucoză, glutation, ATP etc.), compuși metalici și metaloizi (fosfor, sulf, cupru, zinc etc.), precum și alte numeroase substanțe, toate având un rol în metabolismul eritrocitar, scopul principal fiind menținerea hemoglobinei, timp de 4 luni (durata de viață a eritrocitului) în stare funcțională de oxihemoglobină, cu rol de a lega și transporta în mod labil (necovalent) oxigenul.

Hemoglobina. În condiții normale, Hb se găsește în proporție de 33% din conținutul eritrocitelor (normocromie). Ea nu poate depăși 1/3 din greutatea proprie.

Moleculele de hemoglobină au un aspect sferoidal, cu un diametru de circa 50/60 Å și sunt alcătuite din două perechi de lanțuri polipeptidice simetrice (tetramer format din două lanțuri alfa și două non-alfa). Numărul lor se ridică, într-un eritrocit, la aproape 300 de milioane. Macromoleculele de hemoglobină sunt dispersate în lichidul apos din interiorul eritrocitelor. În anumite condiții patologice, tetramerii de hemoglobină se polimerizează. Precipitatele de hemoglobină iau aspecte diferite, după natura „leziunii biochimice" a hemoglobinopatiei sau a enzimopatiei: sub formă de baghete sau tactoizi (ca în siclemie), sub formă globuloasă, de corpi Heinz (ca în hemoglobinopatiile instabile sau în unele enzimopatii), sub formă de cristale (ca în hemoglobinopatia C) etc. Rezultatul va fi atât funcțional, cât și de scurtare a duratei de viață eritrocitară (vezi și capitolul 6 — Hemoglobinele).

Enzimele eritrocitare reprezintă circa 2% din cantitatea de macromolecule din interiorul eritrocitelor, numărul lor este ridicat și acționează în serie, pe mai multe căi metabolice: ciclul glicolitic, șuntul pentoză fosfat, enzime de apărare contra activităților oxidative etc. Discrepanța cantitativă între cele două grupe macromoleculare eritrocitare, hemoglobină și enzime, este dată de modul diferit de acțiune, hemoglobinele participând stoichiometric la legarea oxigenului, iar enzimele catalitic, neluând parte la reacția propriu-zisă (vezi și capitolul: Metabolismul enzimoenergetic al eritrocitului).

Pompa ionică. Pe parcursul celor 120 de zile de viață în circulație, eritrocitele trebuie să-și păstreze un număr de constante funcționale cu ajutorul cărora să poată face față rolului ce-l au de îndeplinit în transportul oxigenului. Membrana eritrocitară este înzestrată cu o pompă aspiratoare-respingătoare de sodiu, potasiu, calciu, CO_2, glutation, glucoză, cataboliți etc. Punerea în activitate a acestei pompe se face cu

o cheltuială de energie rezultată, în principal, pe calea glicolizei și acumulată în moleculele de ATP. Acest rol major al eritrocitului se realizează prin:

— menținerea constantă a volumului eritrocitar; aceasta se obține prin reglarea concentrației Na^+ și K^+, membrana fiind practic impermeabilă la acești cationi; ei balansează în cele două direcții printr-un transport activ (intra- și extraeritrocitar) numit pompă ionică, asigurată de o enzimă numită Na^+, K^+-ATPază, astfel încât să se mențină un „dezechilibru" de circa 10 mEq/1, respectiv 100 mEq/1 (fig. III.7);

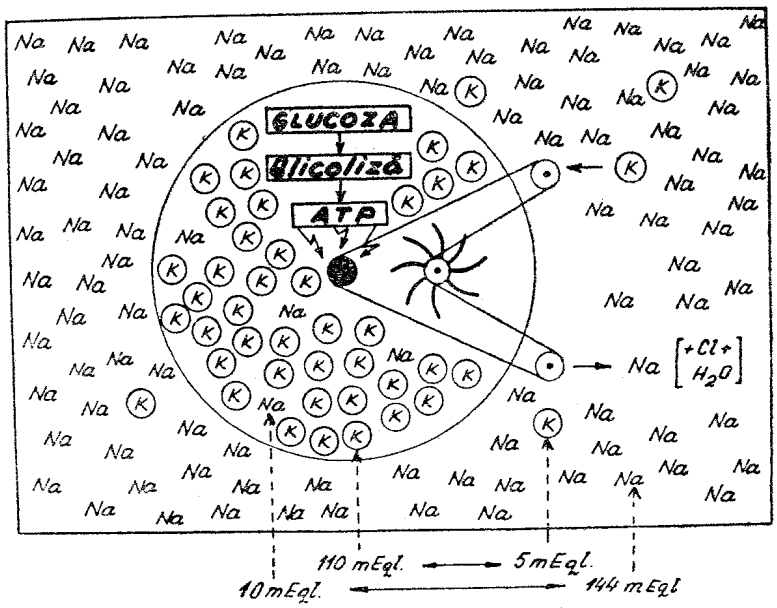


Fig. III.7. — Reprezentare figurativă a pompei de ioni în eritrocitul matur.

— homeostazia calciului este asigurată prin pompa calcică cu ajutorul enzimei Ca^+-ATPază; acest cation este nociv pentru eritrocit când nu este menținut în echilibru; când Ca^+ este în exces, eritrocitul devine crenelat (deshidratat) și își pierde capacitatea de deformare, fiind susceptibil la sechestrare splenică și hemoliză, iar când concentrația calciului scade, eritrocitul devine sferic prin pierdere de substanță (spiculi ce se desprind de pe suprafață);

— prin schimbul de anioni eritrocitul preia, de la nivelul alveolelor pulmonare, anhidraza acidului carbonic (CO_2^-) pe care o combină cu H_2O și o transportă sub formă de acid carbonic (CO_3H_2, cel mai slab acid cunoscut). Acest schimb masiv se face cu anionul Cl^- și necesită un număr mare de canale pe suprafața eritrocitului (circa 1 milion), fiind asigurat de moleculele integrate în stratul lipidic al membranei, în principal de anchirina 3.

FUNCȚIA RESPIRATORIE A ERITROCITELOR

În funcția sa de cărăuș, sângele transportă ceea ce i se oferă. Fiind un organ difuz și în permanentă mișcare, el scaldă fiecare celulă hrănind-o sau încărcându-se cu produșii ei de excreție, utili sau nocivi organismului.

Principalele funcții legate de transportul sanguin sunt: funcția respiratorie, nutritivă, de excreție, de coordonare endocrinoumorală și de apărare, reglarea temperaturii corpului, a presiunii sanguine și a circulației în general, reglarea echilibrului hidromineral, acidobazic și altele.

Funcția respiratorie a sângelui constă în transportul oxigenului din aerul atmosferic la țesuturi și a bioxidului de carbon de la țesuturi la plămâni, de unde este eliminat în exteriorul organismului. Prin această funcție, eritrocitele au un rol de intermediar între mediul extern și mediul intern. Oxigenul vehiculat la țesuturi ia parte, în continuare, la majoritatea proceselor biologice celulare, din care rezultă apă și CO_2. În acest sens, „respirația" constă din două etape distincte: externă și internă.

Transportul oxigenului în organismul uman este realizat de hemoglobina eritrocitară; ea reprezintă marele rezervor de oxigen al corpului. Cele aproximativ 800 g de hemoglobină ale unui individ sănătos conțin circa 1 000 cm^3 O_2, dacă este saturată în întregime (1 g Hb poate capta 1,34 cm^3 O_2). Un individ în stare de repaus consumând circa 300 ml de oxigen pe minut, rezervele sale de oxigen din sânge nu ajung mai mult decât pentru 3 minute, chiar dacă acest oxigen ar putea fi consumat până la epuizarea lui totală. Omul nu posedă rezerve de oxigen, oxihemoglobina constituie doar o rezervă în condițiile asigurării unei respirații normale sau foarte aproape de cea normală.

Sângele venos, agitat la aer, își schimbă culoarea; din roșu închis el devine roșu aprins, deoarece hemoglobina, fixând oxigenul, se transformă în oxihemoglobină. Legarea și desprinderea oxigenului la hemoglobină, mioglobină și la hemoglobina pură (soluție de hemoglobină dizolvată în apă după liza eritrocitelor) nu se face după o linie oblică dreaptă, ci cu anumite inflexiuni (fig. III.7 a).

Curba de disociere a hemoglobinei nu trebuie văzută nici ea în mod static, ci ca pe o sinusoidală rezultată din jocul influențelor diferiților factori asupra hemoglobinei, supuse unor presiuni variabile de O_2 și CO_2 (fig. III.7 b).

MORFOLOGIA ȘI CONSTANTELE ERITROCITARE NORMALE

Morfologie. Forma eritrocitului normal este de disc biconcav, cu marginile rotunjite (fig. III. 8). Acest aspect reprezintă o perfectă adaptare la funcția respiratorie, bazată pe difuziunea gazelor, deoarece sub această formă eritrocitele au suprafața cea mai mare la volumul cel mai redus. Forma biconcavă este rezultanta unei cooperări de forțe intrinseci și extrinseci.

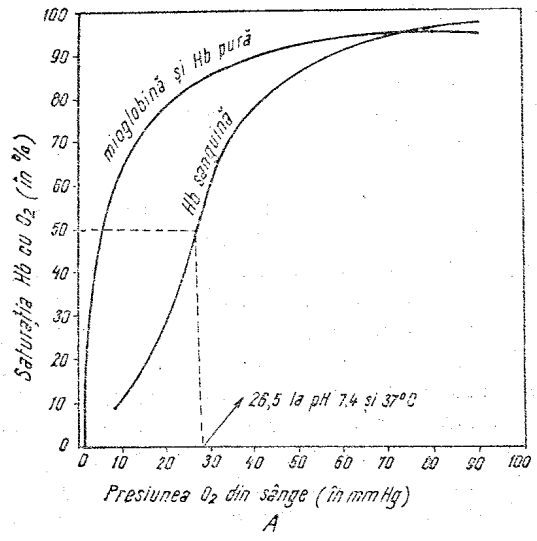


Fig. III.7a. — Curbele de fixare și de disociere a oxigenului pe hemoglobina eritrocitară, pe mioglobină și pe hemoglobina pură.

Hemoglobina eritrocitară descrie o curbă cu o dublă inflexiune, asemănătoare literei sigma a cărei porțiune incipientă apare ca o pantă ușor înclinată, după care urmează o curbă aproape verticală cu o zonă de legare maximă între 20 și 60 mmHg, iar segmentul terminal descrie iarăși o pantă lină. La variații de concentrație a O_2 se produc totuși disocieri mari; în acest fel oxigenul se poate desprinde de Hb și lega de țesuturile sărace în acest gaz.

Disocierea mioglobinei și a hemoglobinei dizolvate este diferită de a oxihemoglobinei. Afinitatea mioglobinei pentru oxigen este de aproximativ 5 ori mai mare decât a mioglobinei eritrocitare; sângele cedează mioglobinei oxigenul, chiar dacă se află la presiuni foarte scăzute, de exemplu, la presiunea de 20 mmHg, circa 2/3 din O_2 a și fost fixat de mioglobină. Curba de disociere descrie astfel o linie ce se ridică abrupt, aproape paralel cu ordonata, presiunile mari nefiind necesare pentru această legare.

Indiferent de felul substanței heminice (OxiHb, mioglobină sau Hb pură), fenomenul se petrece invers când țesuturile eliberează O_2, cedându-l acestora.

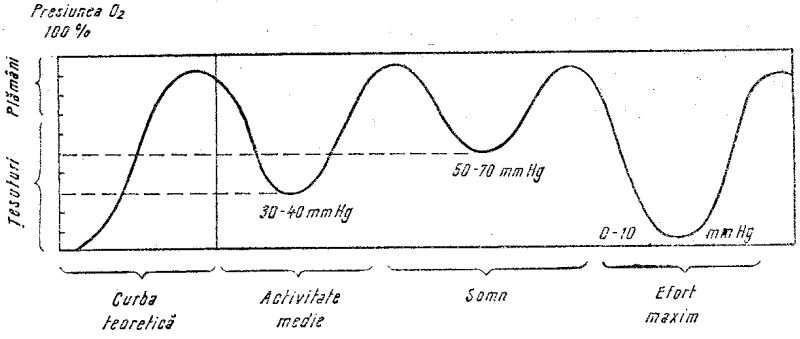


Fig. III.7b. — Succesiunea curbelor de disociere a oxigenului în diferite situații fiziologice și patologice.

Cedarea și captarea oxigenului alveolar și tisular se desfășoară ca o „undă" ale cărei inflexiuni nu sunt rigide. Aceste presiuni sunt, în aerul alveolar, în jur de 100 mmHg pentru O_2 și de circa 46 mmHg pentru CO_2. În sângele venos, unda presiunilor scade la circa 30—40 mmHg pentru O_2 (sau chiar la zero în cursul eforturilor mari), coborând relativ puțin în cursul somnului (60—70 mmHg), pe când presiunea CO_2 este mai puțin variabilă din cauza sistemelor tampon. În stările de asfixie, când sângele nu se mai primenește cu oxigen, presiunea O_2 la nivelul alveolelor fiind zero, acest gaz continuă să se consume din sânge până la epuizarea lui aproape totală, atâta timp cât persistă contracțiile cardiace.

Întinse în strat subțire pe frotiul necolorat, eritrocitele apar roz-palide; în strat mai gros această culoare se intensifică. Masa eritrocitară are o culoare roșie închisă, caracteristică. Culoarea dată de hemoglobina eritrocitară fiind prea slabă, se recurge la colorația panoptică May-Grünwald-Giemsa (MGG) care, deși modifică nuanța lor naturală, permite o

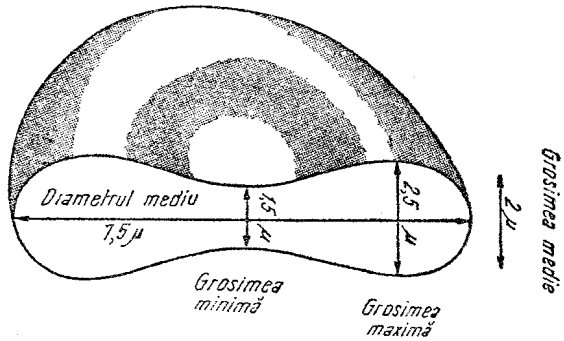


Fig. III.8. — Secțiune imaginară printr-un eritrocit cu specificarea dimensiunilor medii.

mai bună studiere morfologică. Astfel prelucrate, ele apar mai intens colorate, spre periferie, unde grosimea este maximă și mai slab colorate la centru. În circulația lor endovasculară, eritrocitele se deplasează sub formă de fișicuri. Această dispoziție poate fi bine vizualizată, atât în picătura de sânge proaspăt, cât mai ales în vasele mezenterului de broască sau ale aripii de liliac. Când circulația sângelui este rapidă (traversarea prin vase mari), eritrocitele iau formă aerodinamică (fusiformă). Vasoconstricția nu împiedică înaintarea eritrocitelor; fără această capacitate de deformare ar urma ca în zonele de vasoconstricție ele să se aglomereze foarte mult (fig. III.9).

Constantele eritrocitului normal. Eritrocitele normale prezintă o serie de constante care, în condiții normale, fluctuează în limite strânse. Dintre acestea, cele mai importante sunt: numărul de eritrocite pe mm^3, hematocritul și cantitatea de hemoglobină în g/100 ml sânge.

Numărătoarea eritrocitelor este una din cele mai folosite probe pentru cercetarea gradului de anemie, deși este mult mai puțin precisă decât determinarea hematocritului și a hemoglobinei. Astăzi, multe laboratoare au renunțat la practicarea ei. În mod normal, numărul de eritrocite pe mm^3 este de 5 400 000 la bărbați (cu variații de $\pm$800 000) și de 4 800 000 (cu variații de $\pm$600 000) la femei. La nou-născut, valorile apar mai ridicate (5 000 000), cu variații de circa 1 000 000 în plus sau în minus.

Valorile normale ale hematocritului sunt de 45% pentru bărbați (cu fluctuații de 5%) și de 42% la femei (cu variații de 4%). La nou-născut este de 54%, cu variații de $\pm$10%.

Valorile normale ale hemoglobinei sunt de circa 15 g/100 ml sânge, la bărbați (cu fluctuații cuprinse între 12 și 17 g), și de 14 g/100 ml, la femei (cu variații între 12 și 16 g). La nou-născut valorile normale sunt de 19 g, cu variații de 4 g în plus sau în minus.

Determinarea hemoglobinei și a hematocritului sunt cele mai fidele și mai cerute examene de laborator pentru depistarea anemiilor și a poliglobuliilor.

Diametrul eritrocitar mediu are valoare îndeosebi pentru cercetări hematologice, în vederea reprezentării variațiilor de mărime ale eritrocitelor (curba Price-Jones). În condiții normale, circa 70% din eritrocite sunt cuprinse între 7,2 și 7,5 μm, iar 15 procente depășește cu 1 μm, în

Fig. III.9. — Secțiune transversală printr-un capilar (după I. Rhodin).

În mijlocul capilarului se remarcă două eritrocite (de culoare foarte închisă), unul secționat pe mijloc, iar altul (sus), secționat la nivelul cozii. În stânga un trombocit (microscopie electronică, mărire ×30 000).

stânga și în dreapta, acest „turn" ascuțit median. Grosimea eritrocitară este inegală, în centru fiind cu circa 1 μm mai mică față de zona marginală. Grosimea eritrocitară medie este de 2 μm.

Dintre celelalte constante eritrocitare, amintim:

— *volumul eritrocitar mediu (VEM)* $= \frac{\text{hematocrit}}{\text{nr. eritrocite}} = 85—90\ \mu m^3$;

— *hemoglobină eritrocitară medie (HEM)* $= \frac{\text{hemoglobină}}{\text{nr. eritrocite}} = 30\ \mu\mu g$;

— *concentrația medie de hemoglobină eritrocitară (CHEM)*= $= \frac{\text{hemoglobină}}{\text{hematocrit}} = 34\%$ și exprimă cantitatea de Hb în g la 100 ml masă eritrocitară;

— *suprafața eritrocitară medie* (SEM) se calculează din diametrul eritrocitar mediu și volumul eritrocitar mediu.

Abaterile de la normal a acestor constante sunt reprezentate în fig. III.10.

VARIAȚIILE ȘI ANOMALIILE MORFOLOGICE ȘI FUNCȚIONALE ALE ERITROCITELOR

Abaterile de la morfologia eritrocitară normală pot fi sesizate sub următoarele 4 aspecte: variații de mărime, de formă, de culoare și punerea în evidență a diverse incluziuni eritrocitare. Acest dismorfism eritrocitar se înfățișează, pe frotiul sanguin, adeseori asociat și cu particularități pentru anumite boli (fig. III.11).

1. VARIAȚII DE MĂRIME

a) *Microcitele* sunt eritrocite mature cu dimensiuni sub valorile normale. Există și o microcitoză fiziologică, dar aceasta nu depășește 20% din totalul eritrocitelor, iar dimensiunile lor nu scad cu mai mult de 1—1,5 μm sub cele ale valorii normale medii. În microcitozele patologice, peste 1/4 din totalul eritrocitelor au un diametru mai mic de 6 μm, o grosime medie de 1,5 μm, un volum de 60—80 μm^3 sau mai puțin și o suprafață de 100 μm^2 (N=120—135 μm^2). Încărcarea eritrocitului cu Hb este redusă, nu numai din cauza volumului său scăzut ci, de cele mai multe ori, din cauza încărcării subnormale a eritrocitelor cu acest pigment. Microcitul apare pe frotiu, adesea, cu o zonă mai clară la mijloc, iar când aceasta este foarte pronunțată, este numit *anulocit*. Microcitoza este una din caracteristicile anemiilor hipocrome. Ea mai poate fi întâlnită în talasemiile homozigote, alături de un pronunțat dismorfism eritrocitar, și în unele anemii hemolitice.

b) *Macrocitele* sunt eritrocite mature cu dimensiuni situate peste valorile normale, în general cu diametrul peste 9 μm și volum peste 100 μm^3. În macrocitoza fiziologică acestea nu depășesc 20% din totalul eritrocitelor. Macrocitoza ca atare nu se însoțește de modificări calitative pronunțate, toate dimensiunile eritrocitare fiind mărite proporțional. Pe frotiul sanguin macrocitele apar intens colorate, uneori cu dispariția zonei mai clare din centru.

Macrocitoza fiziologică apare și la nou-născut în primele două săptămâni de viață, alături de o anizocitoză importantă. Macrocitoza patologică apare în toate stările însoțite de creșteri importante ale numărului de reticulocite. În afară de macrocitoza din reticulocitoze se descrie o macrocitoză adevărată, urmarea unei tulburări a mecanismului de proliferare a eritrocitelor, întâlnită în insuficiența hepatică. Macrocite se întâlnesc în numeroase boli ale sistemului eritropoietic: anemii: hemolitice dobândite (tip Dyke-Young), anemii hemolitice ereditare nesferocitare,

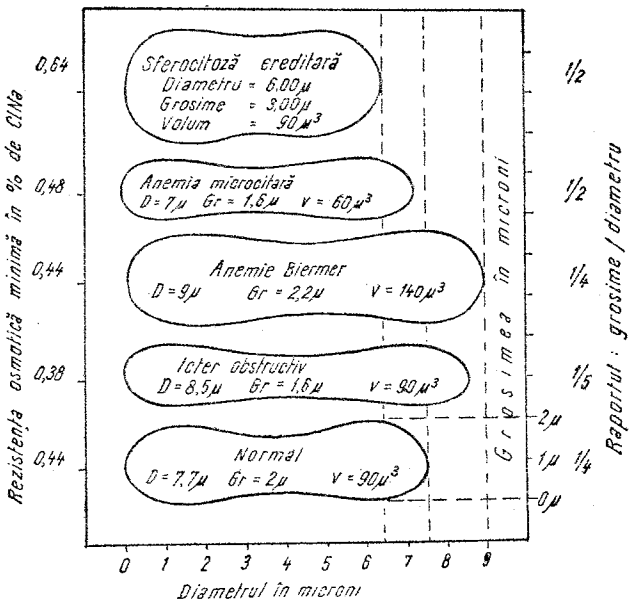


Fig. III.10. — Diametrul, grosimea medie și volumul eritrocitar în stare normală și în diferite stări patologice.

Pe abscisă sunt trecute diametrele eritrocitelor, pe ordonata din dreapta, raportul dintre grosime și diametru (din care rezultă indicele de sfericitate), iar pe cea din stânga este indicată rezistența osmotică a acestor eritrocite.

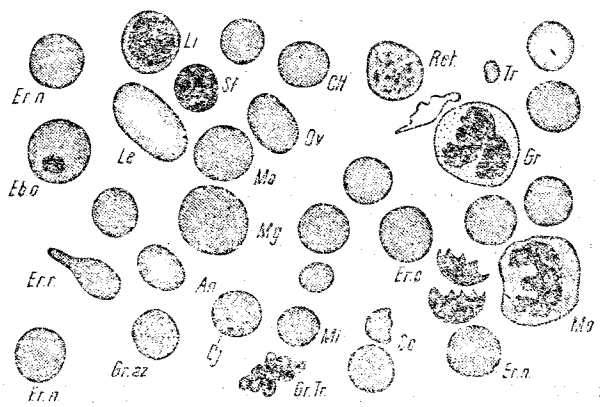


Fig. III.11. — Montaj intuitiv a unui „câmp microscopic" de frotiu de sânge în care sunt reprezentate principalele elemente figurate ale sângelui normal și patologic, în principal din seria roșie.

Legenda: Er.n.=eritrocit normal; Er.c.=eritrocit ciupit; Er.r.=eritrocit în rachetă; Sf.=sferocitoză ereditară; Ma.=macrocit; Mg.=megalocit; Mi.=microcit; An.=anulocit; Le.=leptocit; Ov.=ovalocit; Sc.=schizocit; Eb.o.=eritroblast oxifil; CH=corpi Heinz; CJ=corpi Jolly; Gr. az.=granulații azurofile; Ret.=reticulocit; Tr.=trombocit; Gr.Tr.=grup trombocitar; Li.=limfocit; Gr.=granulocit; Mo.=monocit. (Este știut că pentru a vizualiza toate aceste elemente se folosesc, în mod separat, mai multe tipuri de coloranți.)

anemii aplastice, hemocromatoză, anemii toxice (plumb, benzol, aur, arsenic), în nefropatii cronice, în unele cancere (gastric, pancreatic), după iradiere, după unele medicamente: citostatice, antivirale (Zidovudine, salazopirină).

Prezența în număr mai mare de eritrocite cu diametre deosebite poartă numele de anizocitoză și este întâlnită în multe forme de anemii. Anizocitoza cu predominanță de eritrocite mici se numește anizomicrocitoză și cea cu predominanță de eritrocite mari este numită anizomacrocitoză. Adesea, anizocitoza este asociată cu poikilocitoza (anizopoikilocitoză).

c) *Megalocitele* sunt eritrocite mature, de talie foarte mare, cu semnificație totdeauna patologică. Dimensiunile lor depășesc cu mult pe cele normale: diametru 12—15 μm, VEM 120—140 μm^3, HEM 40—50 μμg etc. Pe frotiu apar, adesea, de formă eliptică; ele nu prezintă zona clară centrală, apărând astfel colorate omogen, mai intens decât eritrocitele obișnuite. Încărcarea cu hemoglobină (CHEM) nu depășește nici la megalocit 1/3 din volumul eritrocitar (hipercromia fiind doar aparentă).

Megalocitele rezultă dintr-o alterare profundă a procesului de proliferare. Diferențierea megalocitelor de macrocite întâmpină uneori dificultăți în formele incipiente de boală Biermer. În formele avansate, diferențierea se face după criteriul dimensional. Cel mai sigur mijloc de diagnostic în această boală este puncția sternală, care pune în evidență prezența megaloblaștilor, mult mai tipici pentru diagnostic. Megalocite pot apărea și în stările care produc macrocitoză.

d) *Schizocitele* sunt fragmente de eritrocite cu diametrul de 2—4 μm, de formă rotundă sau neregulată, fără formă biconcavă, multe din ele fiind hipocrome. Unii autori le numesc fragmentocite, pentru a sublinia faptul că nu provin dintr-o serie celulară specială. Mecanismele de producere a schizocitelor sunt multiple. Unele sunt fragmente de eritrocite patologice (poikilocite, megalocite, eritrocite în țintă etc.), altele pot proveni din eritrocitele normale, prin fragmentare mecanică. Schizocitele pot fi consecința fagocitării parțiale a eritrocitelor. Durata de viață a schizocitelor este scurtă, iar capacitatea lor funcțională este, de asemenea, redusă. Ele sunt caracteristice pentru hemolizele traumatice sau microangiopatice, dar pot fi găsite și în anemia feriprivă, în anemii megaloblastice, în chimioterapia anticanceroasă.

2. VARIAȚII DE CULOARE

Variații de culoare survin în următoarele împrejurări: persistența unor organite citoplasmatice (mai ales ribosomi), care le imprimă o tentă albăstruie, încărcare slabă cu hemoglobină, creștere a volumului eritrocitului sau a grosimii acestuia, dând impresia falsă pe frotiu că ar fi supraîncărcate cu hemoglobină (anemii „hipercrome").

a) *Eritrocitele policromatofile și bazofile* sunt eritrocite tinere care nu au ajuns încă la maturare completă după expulzarea nucleului; ele corespund, deci, reticulocitelor. Culoarea lor pe frotiul colorat MGG este roz-albăstruie, roz-cenușie sau roz-violet pentru cele policromatofile și cu nuanță net albăstruie pentru cele bazofile. Prezența în număr

redus (1—2%) a unor eritrocite cu tentă policromatofilă, puțin accentuată, este fiziologică. Numărul lor mare sau tenta albastră mai pronunțată sunt indicii fie ale unui efort de regenerare intensă (anemie hemolitică), fie ale unei tulburări a diabazei (mielosclerozâ), fie un semn de maturare citoplasmică (plumbism).

b) *Acromocitele și acromoreticulocitele.* Acromocitele sunt reticulocite tinere, cu o foarte slabă încărcare cu hemoglobină, apărând mult mai palid colorate. Spre deosebire de reticulocite, care provin din eritroblaștii oxifili, acromoreticulocitele provin din eritroblaștii policromatofili sau chiar bazofili care și-au expulzat, de timpuriu, nucleul, înainte de a se fi încărcat suficient cu hemoglobină. Ca dimensiuni sunt mai mari decât reticulocitele (10—12 μm), iar, după maturare, în sângele periferic, devin acromocite (celule fără culoare); pe frotiu apar ca macrocite palide. Creșterea lor în sângele periferic are aceeași semnificație ca și aceea a reticulocitelor sau a precursorilor eritrocitari nucleați și traduce un efort de regenerare medulară în prezența unei tulburări de maturare eritrocitară (talasemie homozigotă).

c) *Eritrocitele hipocrome* apar pe frotiu mai palide în comparație cu cele normale. Hipocromia este însoțită, de cele mai multe ori, de microcitoză, ca în anemiile hipocrome feriprive. *Anulocitele* sunt eritrocite intens hipocrome, care dau impresia concentrării hemoglobinei exclusiv la periferie; din această cauză, centrul lor apare decolorat, celula semănând cu un inel. De cele mai multe ori ele sunt microplaticite. Anulocitele se întâlnesc în anemiile feriprive, în talasemii, dar și în anemii grave de alte cauze (neoplasme, leucemii acute etc.).

Anizocromia se caracterizează prin prezența concomitentă de eritrocite normocrome alături de altele hipocrome, datorită încărcării lor inegale cu hemoglobină. Ea este, de asemenea, un indiciu de tulburare a eritropoiezei, fiind întâlnită în numeroase tipuri de anemii. Policromatofilia este menționată în cazurile de persistență a unui anumit rest de bazofilie; ea exprimă o eritropoieză accelerată, cu punerea în circulație a unor eritrocite încă nematurate, cu conținut de constituenți citoplasmatici după expulzia nucleului.

3. VARIAȚII DE FORMĂ

a) *Eliptocitele* sau *ovalocitele* sunt eritrocite de formă ovală; diferența dintre cele două diametre este variabilă, dar relativ constantă la același subiect (de exemplu, 8/5 μm). Prezența unui număr redus de ovalocite, cu diferențe între cele două diametre de 1—2 μm, este fiziologică. Ovalocitoza secundară se întâlnește în boala Biermer, în anemii feriprive, anemii carențiale grave sau asociate infecțiilor, neoplasme, în mielofibroză. Ea este caracteristică pentru eliptocitoza ereditară.

b) *Poikilocitele* reprezintă forme eritrocitare negeometrice, neclasificabile sau variate pe același câmp microscopic. Pe frotiu ele apar cu formele cele mai bizare: de rachetă, pară, corn (keratocite), picătură, virgulă, șirul de asemănări putând fi continuat după imaginația autorului — lacrimă (lacrimocite), clopot (codocite), măciucă etc. Fragilitatea poikilocitelor este crescută, aspectul lor deformat accentuându-se cu ocazia întinderii frotiului. *Poikilocitoza* traduce o regenerare intensă

și patologică a eritropoiezei și este întâlnită în: anemii hemolitice grave, anemii carențiale severe, mielosclerozâ, leucemii acute, neoplasme cașectizante, uremie etc. Eritropoieza extramedulară furnizează circulației un număr mare de poikilocite. Când predomină un anumit aspect de eritrocite, se folosește adjectivul care le caracterizează mai mult: drepanocitoză (gr. drepane=seceră), ovalocitoză, acantocitoză, eritrocite ciupite etc. Foarte frecvent se asociază, la același eritrocit, câte două sau mai multe alterări morfologice, putându-se întâlni sferoechinocite, sferostomatocite, echinoacantocite, ovaloplaticite, leptoanulocite etc.

c) *Eritrocitele „ciupite"* (knitocite), spre deosebire de schizocite, care reprezintă fragmente dintr-un eritrocit, sunt eritrocite din care s-a desprins un fragment. Rezistând la această „rănire" și cicatrizare, ele rămân cu un grad de uzură. Aspectul lor este diferit: în coajă de ou, lună în al doilea sau al treilea pătrar (selenocite) etc. Ele apar fie în urma unei fragilități intrinseci (boală Biermer) fie, mai ales, în urma expunerii eritrocitelor normale unor traume puternice: proteze valvulare, CID, scleroză renală, hipertensiune arterială malignă, anemii hemolitice microangiopatice (în care vasele sunt, nu numai înguste, ci și rugoase, din cauza depozitării de fibrină pe pereții lor) etc.

d) *Eritrocitele excavate* prezintă, de asemenea, o mare heterogenitate din cauza aspectelor lor bizare: eritrocite în farfurioară, în coif, capișon, clopot (codocite), gură de scoică (stomatocite) etc. Ele pot fi întâlnite în numeroase anemii, mai ales hipocrome (feriprive severe, talasemii homozigote), în intoxicații, cancere generalizate etc. Acest aspect apare foarte evident la stereoscan sau pe secțiuni la microscopul electronic.

e) *Platicitele* sau *leptocitele* sunt eritrocite cu volum normal, dar cu un diametru longitudinal crescut și grosime scăzută, ceea ce le conferă o formă plată. Când încărcarea cu hemoglobină este scăzută, platicitele apar mai palide și se aseamănă cu anulocitele (torocite). Forma pură de platicitoză apare rar; în talasemiile homozigote fac parte din dismorfismul eritrocitar al bolii.

Eritrocitele în *„semn de tras la țintă"* sau în *„șaibă"*, întâlnite în literatură și sub denumiri ca: *target-cell, sombrero* etc., sunt eritrocite patologice care apar pe frotiu ca și cum ar avea un exces de membrană față de volumul lor (membrana ondulată acoperind o mică cantitate de hemoglobină la periferie și alta în centrul lor). Eritrocitele în șaibă se întâlnesc mai ales în talasemia majoră, în hemoglobinopatia C homozigotă; în număr mai mic și inconstant apar în toate anemiile grave însoțite de hipocromie, precum și după splenectomie. Ocazional și în număr mic se pot observa și la subiecți sănătoși. Ele au o rezistență osmotică crescută ce poate ajunge până la concentrații de NaCl 0,2%.

f) *Sferocitele* sunt eritrocite al căror diametru longitudinal scade în favoarea celui transversal, astfel că, deși diametrul lor nu depășește 6 μm, volumul se menține normal. Pe frotiu apar mai intens colorate, lipsite de zona centrală clară. Din această cauză, cu toată încărcarea normală cu Hb, sferocitele apar hipocrome. Prin dispariția zonelor concave centrale, suprafața lor se reduce cu 20—30% față de cea a eritrocitelor normale. Aspectul sferic este dat de pierderea de substanțe din membrana eritrocitară. El reprezintă inversul față de eritrocitele

în țintă, incidență în care conținătorul este în exces față de conținut. Întrucât suprafața eritrocitară și conținutul eritrocitului trebuie să fie într-un raport fix (membrana neputându-se lărgi sau întinde), acesta devine sferic și, implicit, rigid. Prezența microsferocitelor este caracteristică bolii Minkowsky-Chauffard (sferocitoza ereditară). În număr mai mic pot fi întâlnite în unele anemii hemolitice, mai ales de cauză extraeritrocitară (în primul rând prin acțiunea anticorpilor antieritrocitari), în hemoliza microangiopatică și în hipofosfatemie. Sferocitoza apare constant înaintea hemolizelor brutale, forma sferoidă fiind un stadiu premergător hemolizei (umflare prehemolitică). În stare normală, numărul lor nu depășește 1%. Sferocitele sunt mult mai fragile în soluții hipotone decât eritrocitele normale. De asemenea, ele se hemolizează rapid chiar în plasma proprie; incubate la 37°C, ele se lizează în mai puțin de 48 de ore, dar se corectează prin adaos de glucoză (vezi testul de autohemoliză).

g) *Drepanocitele* sau *eritrocitele în seceră* din talasemia-S apar în urma transformării (reversibile sau ireversibile) a discocitelor în drepanocite, determinată de polimerizarea HbS cu așezarea moleculelor de hemoglobină patologică sub formă de baghete elicoidale. Eritrocitele devin distorsionate, rigide, cu aspect de lună nouă, incapabile de a trece prin capilarele înguste ale țesuturilor și favorizând obstruările, ceea ce explică frecventele infarctizări și procese hemolitice din această hemoglobinopatie.

h) *Acantocitele,* asemănătoare frunzelor de acant, au pe suprafața lor numeroase excrescențe terminate prin spiculi. Eritrocitele normale pot lua forma de acantocite dacă sunt incubate timp de 24 de ore la 37°C. Acestea apar sferice și sunt acoperite de spini regulați și fini care dispar în mediu cu albumină, luând din nou forma de discocit. Uneori, frotiuri de sânge incorect întinse pot simula existența acantocitelor, care sunt însă artefacte de întindere. Aspectul lor este alteori real în anumite circumstanțe în care sunt implicate „toxine" prezente în plasmă — uremie, ciroză în faza terminală, alcoolism cronic, malnutriții severe, cancere extinse, dar și în unele anemii hemolitice, ca anemia hemolitică angiopatică, purpura trombotică trombocitopenică etc. Acantocitoza apare și într-o foarte rară boală, abetalipoproteinemia, ce mai prezintă, în contextul ei clinic, retinită pigmentară atipică, steatoree, ataxie etc. și care are la bază absența beta-lipoproteinemiei (vezi patologia membranei eritrocitare). Acantocitele mai sunt numite și picnocite, eritrocite crenelate, în roată dințată, în coajă de castană, *spur* (pinten) *cells, burr* (spin) *cells,* echinocite (de la *equinus*=arici de mare) etc. (fig. III.11).

4. INCLUZIILE ERITROCITARE

Sunt formațiuni de natură heterogenă conținute în eritrocite. Ele au aspecte variate (după formă, volum, număr, așezare, culoare), precum și proveniență diferită. Unele sunt resturi de nucleu (corpusculii Howell-Jolly), altele sunt date de molecule de hemoglobină patologică precipitată (corpii Heinz), pe când altele reprezintă vestigii ale citoplas-

mei eritroblaștilor (reticulocitele, granulațiile bazofile) sau chiar resturi metalice (siderosomii).

a) *Corpusculii Howell-Jolly* reprezintă granulații rotunde, dense, colorate în albastru închis sau violet, unice sau în număr redus (2—3 într-un eritrocit), cu dimensiuni de 1—3 μm. Ele sunt net vizibile la coloratia MGG și reprezintă condensări de cromatină nucleară rămasă, în mod patologic în eritrocit. În cazurile de diviziuni anormale din cursul migrării spre cei doi poli ai celulei, fragmente de cromosomi, sau chiar cromosomi întregi, întârzie până după constituirea membranei nucleare, rămânând aberanți în citoplasmă, iar la expulzarea nucleului nu părăsesc celula odată cu acesta. Numărul corpusculilor Howell-Jolly (H-J) crește în anumite stări patologice; se pot întâlni în toate anemiile grave, mai ales în anemiile megaloblastice, unde constituie un semn important de diagnostic. Aici prezintă unele caracteristici ca: număr mai mare, dimensiuni inegale, uneori dispoziție în rozetă etc. Corpii H-J sunt observați în număr crescut după splenectomie; absența lor în acest caz sugerează existența unor spline accesorii. Ei mai sunt întâlniți în talasemie, leucemii, sprue, atrofii sau aplazii splenice și în toate regenerările intense eritrocitare.

b) *Granulațiile bazofile* sau punctațiile bazofile apar pe frotiul colorat cu MGG, sub forma de granule minuscule, de culoare albastră sau albastră-violacee, răspândite pe toată suprafața eritrocitului. Prezența lor traduce o alterare a elementelor care imprimă policromatofilia eritrocitului tânăr. Există o relație între rețeaua granulofilamentoasă a reticulocitelor, indusă de coloratia supravitală, și granulațiile bazofile eritrocitare, vizibile la coloratia MGG. Materialul din care sunt alcătuite pare să fie constituit din agregate ribosomale, bogate în ARN, la care se pare că s-ar mai asocia și mitocondrii și fier neheminic (siderosomi). Faptul că ele sunt alcătuite, în principal, din ribonucleoproteine explică de ce sunt distruse de ribonuclează. Ele apar în număr mare în intoxicațiile cu plumb și în talasemii, precum și în numeroase stări patologice în care este alterată sinteza hemoglobinei. Există păreri contrarii în legătură cu momentul apariției lor în eritrocit. Faptul că se întâlnesc în mod obișnuit în intoxicațiile cu metale grele a sugerat ideea pătrunderii intravitale a metalelor prin membrana eritrocitară și precipitarea ribonucleoproteinelor. Se pare însă că ele nu preexistă în eritrocite, ci se formează în cursul uscării sau colorării acestora.

c) *Inelele Cabot* sunt formațiuni filiforme ce apar pe frotiu sub formă de linie cu circuit închis de culoare roșie purpurie, descriind figuri diferite: cerc, cifra 8, semilună, rachetă etc. Aceste filamente par să provină din proteinele filiforme ale fusului mitotic care au rămas neabsorbite după terminarea telofazei. Inelele nu sunt patognomonice pentru vreo afecțiune; ele se întâlnesc mai ales în intoxicațiile cu plumb, precum și în toate cazurile de anemii grave, în regenerările intense eritrocitare, în stadiile avansate din boli ca leucemii, cancere etc., ca efect al tulburării mitozei și metabolismului celular.

d) *Corpii Heinz* sunt agregate intraeritrocitare de hemoglobină denaturată oxidativ ce apar numai în eritrocite mature. La coloratii supravitale (cu crezil violet, albastru de Nil, violet de metil sau albastru briliant de crezil) apar sub formă de particule unice sau în număr mic,

de dimensiuni relativ mari. Sunt frecvent întâlniți în hemoglobinopatii cu Hb instabilă, în enzimopatii, precum și după unele medicamente cu proprietăți oxidative, în talasemiile homozigote. În talasemiile homozigote, ei sunt alcătuiți din tetrameri alfa, care au o mare instabilitate în suspensia intraeritrocitară. Splina are capacitatea de a ciupi aceste precipitate fără însă a le distruge. Ei sunt abundenți după splenectomie. În deficiența de glucozo-6-fosfat dehidrogenază, corpii Heinz se atașează de membrana eritrocitară pe care o lezează, favorizând opsonizarea celulei pentru fagocitoză (fig. III.12).

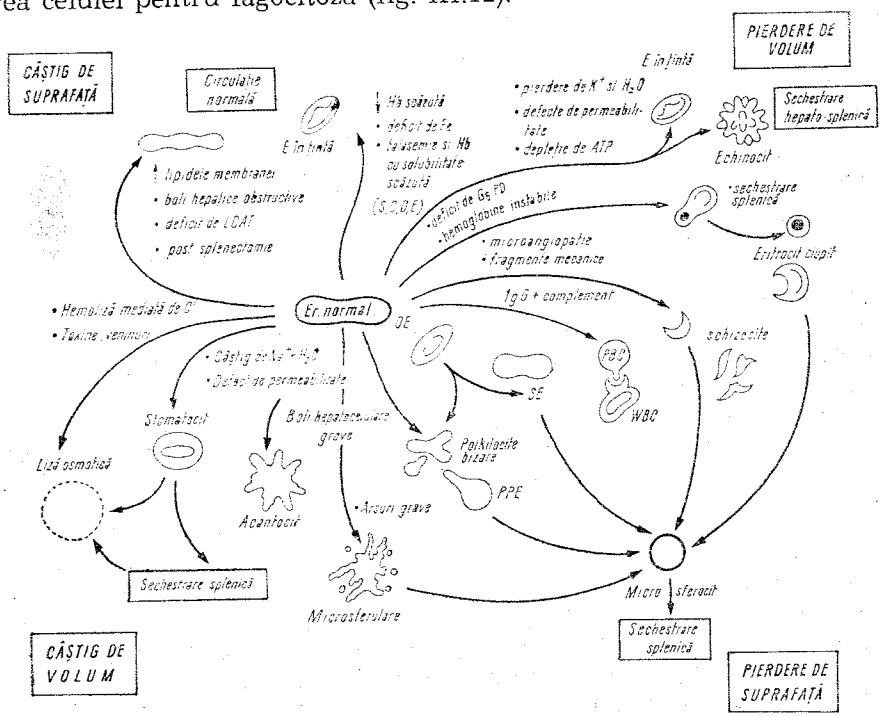


Fig. III.12. — Schematizare rezumativă a principalelor anomalii în care sunt interesate suprafața, volumul și forma eritrocitelor (după S. Beck și R. Tepper, 1991).

HEMOLIZA

În cele patru luni de supraviețuire, eritrocitele din circulație sunt supuse unor multiple solicitări fizice și chimice. În fiecare minut eritrocitele trec de circa două ori printr-un capilar cu un diametru mai mic decât diametrul propriu, fiind supuse unor acțiuni de compresie și deformare. În decursul existenței lor ele vin și pleacă din inimă de circa 500 000 de ori și parcurg, proiectate de forța de propulsie a inimii, o distanță de circa 150—200 km din care aproape jumătate prin teritorii înguste, care le obligă la strangulări, urmate de revenirea la forma inițială. O mare parte din viața lor, eritrocitele o petrec în vase sanguine cu o structură sinusoidală, unde stagnează ore întregi. Așa se întâmplă, de exemplu, în splină, unde eritrocitele trebuie să-și îngusteze

corpul pentru a putea traversa fenestrațiile eliptice înguste care separă cordoanele de sinusurile splenice, pentru a reintra apoi în circulație; această traversare durează în jur de 30 de secunde și este efectuată de circa 120 de ori pe zi.

Eritrocitele bătrâne și cu defecte pot fi însă reținute timp mai îndelungat, până la ore întregi, în mediul acid, hipoxic și hipoglicemic din cordoanele splenice putând fi, până la urmă, lizate. Eritrocitele rigide sau îmbrăcate cu unele proteine, cum sunt IgGl, IgG3 și C3b care se fixează pe receptorii macrofagelor splenice, sunt de asemenea reținute în splină și fagocitate de macrofage. Din sinusurile splenice, terminate cu cordoane înguste de 2—3 μ se poate culege o recoltă bogată și variată de eritrocite, cu diverse defecte intracelulare: resturi nucleare (corpi Howell-Jolly), Hb denaturată intraeritrocitar (corpi Heinz), granulații de fier (siderocite) și un număr variat de eritrocite cu defecte de formă (acantocite, schizocite, eritrocite în picătură etc.). În circulația sanguină, eritrocitele sunt supuse, alternativ, de mii de ori, atât la schimburi gazoase cu aerul alveolar și cu țesuturile, cât și la numeroase schimburi ionice cu plasma sanguină.

Deformările și schimburile chimice au consecințe negative, deoarece la menținerea structurii eritrocitare și la procesele biochimice amintite iau parte numeroase enzime care se uzează și ele fără a putea fi înlocuite. Unul din rezultatele senescenței celulei este pierderea supleței eritrocitare. Odată pierdută capacitatea de transportor de oxigen, eritrocitul nu mai are valoare funcțională și, devenind inutil, este îndepărtat din circulație. În această fază. eritrocitul este recunoscut de celulele macrofage printr-un anumit tactism. Migrarea direcționată a macrofagelor spre eritrocitele în „agonie" nu este încă pe deplin elucidată.

Eritrocitul, fiind lipsit de nucleu și organite citoplasmatice, nu are capacitatea de a-și reînnoi factorii structurali și cei necesari metabolismului său; el părăsește măduva cu o anumită zestre proteică, cu care se poate regla timp de 120 de zile, cu condiția să fie normal structurat și să i se asigure o ambianță „de bună vecinătate" cu mediul în care trăiește (9a).

MECANISME ȘI DETERMINĂRI EXPERIMENTALE ALE HEMOLIZEI

Echilibrul intrinsec și cel extrinsec al eritrocitului pot fi tulburate de factori multipli. Dezintegrarea experimentală a eritrocitelor a fost încercată cu procedee dintre cele mai diverse. Există un foarte bogat material în legătură cu comportarea eritrocitelor sub acțiunea unor factori fizici, ca agitarea, întinderea, supunerea la presiuni, forțarea traversării prin capilare de calibre diferite, înțeparea sau secționarea, expunerea la temperaturi ridicate sau joase, menținerea la soluții hiper- sau hipotone, aplicarea unor fascicule de raze ultraviolete sau laser etc. În afara acestor agenți fizici, au fost folosiți și agenți chimici, medicamentoși și toxine microbiene. Toate aceste testări de laborator au dus la obținerea unor constante fizice care au fost apoi comparate cu cele

ale unor materiale din mediul înconjurător (latex, fibre de mătase, de lână, de sticlă, plumb, fier, piele etc.). S-a constatat o remarcabilă capacitate de rezistență, precum și o mare capacitate de deformare și flexibilitate a eritrocitelor, care le asigură îndeplinirea funcției de cărăuș în rețeaua sanguină o perioadă atât de lungă.

1. **Stabilirea duratei de viață a eritrocitelor.** În practică, se utilizează în exclusivitate procedee radioizotopice. Există trei metode de urmărire radioactivă a duratei de viață a eritrocitelor:

a) calculul indirect de liză, având la bază producția eritrocitară (hemoglobinopoieza), în care caz se folosește radiofierul 59;

b) marcajul unei șarje de eritroblaști de aceeași vârstă *(flash)*, având ca trasor carbonul 14 și azotul 15, încorporați în glicină și metionină;

c) marcajul la întâmplare a populației circulante cu crom 51.

Între aceste trei metode de marcaj există o identitate aproape completă. Prima se aplică în cazurile în care eritrocitele mor prin îmbătrânire, cea de-a doua în cazurile de hemoliză excesivă, iar a treia, care este și cea mai utilizată din cauza simplității ei, are avantajul că poate fi cuplată cu determinarea volumului eritrocitar total și concentrarea eritrocitelor în diferite organe (sechestrare splenică și hepatică). Aceste metode au dus la concluzia că, în condiții normale, aproximativ 9‰ din totalul eritrocitelor se lizează în decurs de 24 de ore, ceea ce corespunde cu circa 50 ml de sânge la un bărbat de talie medie. Același volum se reînnoiește zilnic în masa sanguină circulantă.

2. **Sediile hemolizei.** Eritrocitele îmbătrânite sunt culese din circulația sanguină de către macrofage — tisulare și circulante (monocitele) — și de către granulocite (neutrofile și eozinofile). Macrofagele se găsesc pretutindeni în organism, astfel că eritrofagocitoza și catabolismul hemoglobinei au loc la orice nivel, dar cu precădere în zonele de stază sau circulație încetinită, în care macrofagele se găsesc în număr mai mare (sinusoidele medulare, splenice, hepatice etc.). Îndeosebi la nivelul splinei, în anumite stări patologice, există condiții reologice deosebite (cordoane intersinusale mai strâmte decât în alte zone), care accentuează sechestrarea eritrocitelor. În condiții normale, rolul splinei este secundar în eliminarea eritrocitelor îmbătrânite, rolul ficatului fiind, comparativ, mult mai amplu, în primul rând datorită debitului sanguin de 6 ori mai mare decât al splinei. În condiții patologice, splina poate să dețină rolul principal în eritrofagocitoză.

3. **Fazele eritrofagocitozei.** Cu ajutorul unor metode de laborator (microscopia cu contrast de fază, microcinematografia, microscopul electronic, stereoscanul) s-a putut stabili, cu exactitate, mecanismul eritrofagocitozei. Aceasta se desfășoară în 3 faze: faza de aderență, de înglobare și de digestie:

— faza de aderență sau acolare reprezintă contactul între eritrocitul lezat și celula fagocitantă care îl depistează, iar în zona respectivă se produc, instantaneu, modificări structurale complexe;

— faza de înglobare sau endocitare constă în emiterea, de către macrofag, a unor pseudopode care încercuiesc eritrocitul, trăgându-l în interiorul celulei; în fotografiile tridimensionale se vede că aceste pseudopode apar ca o pâlnie sau gură deschisă (fig. III.13);

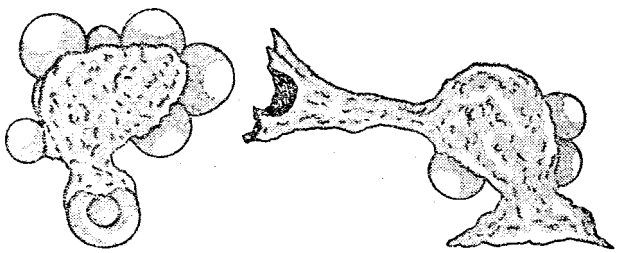


Fig. III.13. — Două macrofage care au fagocitat un număr mare de eritrocite aflate în faze diferite de digestie, unele incluse în citoplasmă, altele abia acolate. Macrofagul din dreapta trimite un tentacul terminat printr-o „pâlnie" citoplasmatică, cu scopul de a acapara o parte din eritrocitul deja captat de un alt macrofag (desen copiat după o fotografie la stereoscan).

— faza de digestie se desfășoară în mai multe etape: eritrocitul ajuns în interiorul macrofagului rămâne un timp învelit în membrana fagocitului (faza de fagosom); spre aceasta se îndreaptă lisosomii care își deversează conținutul lor enzimatic (faza de fagolisom) și faza în care membrana izolatoare se absoarbe, nefiind necesară, iar în locul fagosomului rămân detritusuri care vor reprezenta materialul cu care fagocitul va alimenta eritroblaști de diferite vârste (funcția de „doică" a macrofagului (fig. III.14).

MECANISME DE HEMOLIZĂ PATOLOGICĂ

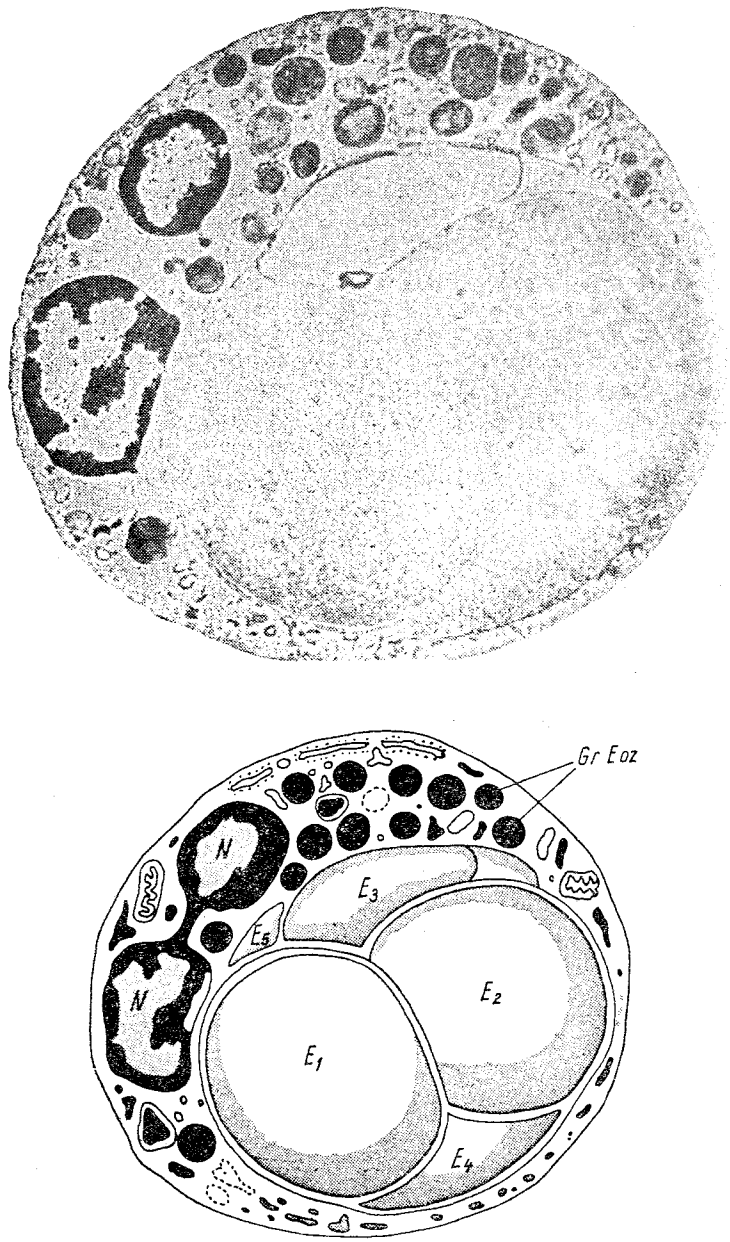
În condiții patologice, există două mecanisme de hemoliză: hemoliza intratisulară (în circulația lentă din sinusurile sanguine) și hemoliza intravasculară (în circulația rapidă), ambele strâns intricate între ele. În anumite maladii predomină fie unul, fie altul din aceste mecanisme.

1. **Hemoliza patologică intratisulară** este o exagerare a hemolizei fiziologice. Spre deosebire de hemoliza fiziologică, unde tactismul de avertizare a macrofagelor este produs de către eritrocitele fiziologic „îmbătrânite" (110—120 de zile), în cea patologică acest tactism este provocat, suplimentar, de unele anomalii de membrană sau conținut eritrocitar neadecvat, care grăbesc consumul enzimatic cu care eritrocitele sunt prevăzute la părăsirea măduvei, dar pe care nu sunt capabile să le reînnoiască după diabază.

Patologia membranei poate fi și ea intrinsecă (sferocitoza ereditară, acantocitoză, piropoikilocitoză etc.) sau extrinsecă. Pe suprafața eritrocitelor au fost puși în evidență receptori specifici pentru anumite imunoglobuline și complement. Eritrocitele normale care devin, prin hazard, purtătoare de complexe imune, aderă de macrofage, după care urmează celelalte etape de hemoliză.

Eritrocitele purtătoare de defecte morfologice (sferocitoză, drepanocitoză, prezența de corpi Heinz etc.) își pierd elasticitatea și filtrabilitatea prin sinusoide, încât blocarea lor devine definitivă.

2. **Hemoliza patologică intravasculară** rezultă din ruperea membranei eritrocitare cu eliberarea, în plasmă, a hemoglobinei din interior încă în cursul circulației rapide.



Fii. III.14. — Fagocitarea de către un eozinofil a 6 eritrocite. Jos, aceeași imagine în desen pentru a se evidenția mai clar unele detalii ale acestui „microfag" (microscopie electronică după M. Bessis; mărire ×20 000).

În dreapta se recunoaște nucleul „în desagă" iar jos granulațiile mari (ca „icrele de Manciuria") ale eozinofilului (lizozomi). În restul citoplasmei se remarcă cele 6 eritrocite fagocitate, aflate în faze diferite de digestie: foarte avansată (E_5 și E_6), medie (E_3 și E_4) și abia înglobate (E_1 și E_2).

Ruptura mecanică a eritrocitelor poate fi provocată de anomalii ale vaselor mari sau mici ale cordului (căi de circulație defectuoase). În primii ani, după aplicarea pe scară largă a chirurgiei vasculare, au fost observate cazuri de exacerbare a hemolizei provocate de valve artificiale, proteze vasculare, circulație extracorporeală, rinichi artificiali. Hemoliza prin acest mecanism a scăzut mult în urma îmbunătățirii materialelor de proteză și a procedeelor tehnice.

Hemolizele cu loc de acțiune la nivelul vaselor de calibru mic sunt mai frecvente și mai pronunțate. Anemia hemolitică microangiopatică este un sindrom heterogen, în care elementul comun îl constituie alterarea arteriolelor și a capilarelor din cauza depunerilor pe pereți a depozitelor de fibrină, cu prezența de eritrocite fragmentate și de hemoliză intravasculară. Ea apare în cursul a numeroase boli cu etiologie și patogenie diferită ca: purpura trombocitopenică trombotică, sindromul hemolitic uremic, hipertensiunea arterială malignă, glomerulonefrita acută etc. Fragmentarea eritrocitară este cauzată de anomaliile endoteliului vascular și de prezența coagulării intravasculare diseminate.

Anumiți agenți fizici pot să provoace liza eritrocitară prin mecanisme diverse: supraîncălzire, raze Röntgen, arsuri etc. Mult discutată ca patogenie este hemoglobinuria de marș, al cărei mecanism de producere este tot mecanic, eritrocitele având un defect structural la nivelul rețelei elastice scheletale.

Hemolizele prin paraziți eritrocitari (hematozoarul palustru), agenți toxici (substanțe chimice industriale de uz casnic sau medicamente), toxine bacteriene sau virotice etc. se declanșează prin mecanisme intricate, predominant intravasculare.

Hemolizele induse prin formare de complexe imune, cu sau fără participarea complementului, constituie un capitol de mare actualitate, care a depășit sfera mecanismelor de hemoliză. Celulele SRH din splină, ficat și alte țesuturi conțin receptori pentru fragmentul Fc al imunoglobulinelor și sunt în măsură să selecteze și să distrugă eritrocitele acoperite cu IgG, precum și eritrocitele ce conțin pe suprafața lor componența C3b a complementului.

Alterarea învelișului protector al hemoglobinei și eliberarea conținutului eritrocitar în circulație se realizează cu o brutalitate extremă în cazurile de transfuzii de sânge incompatibil. În aceste cazuri agresiunea asupra membranei eritrocitare a anticorpilor este de mare intensitate, provocând liza acută a unei cantități importante de eritrocite în însăși circulația sanguină, cu punere în libertate a hemoglobinei (hemoglobinemie) care, fără protecție, devine o proteină circulantă, fără vreo funcție anumită, dar cu efecte patologice grave pe măsura cantității eliberate (hemoglobinemie, blocaj renal etc.). În felul acesta, hemul este catabolizat aberant, căci se formează dipiroli care urmează alt ciclu de descompunere decât al tetrapirolilor. Excreția lor sub această formă duce la excretarea unei urini de culoare intens închisă. Haptoglobina caută să blocheze, pe cât posibil, hemoglobina liberă, dar capacitatea ei este limitată (2).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. ALBERTS B., BRAY D. şi colab.: Biologie moléculaire de la cellule. Ed. Flammarion, Paris, 1987.
2. BECK W.: Hematology. Ed. MIT Press, Londra, 1991.
3. BUNN F.: În: Harrison T. R., Internal Medicine, vol. I, Ed. International, 1991, 345.
4. DEXTER M. J.: Cell. Science, 1987, 1, 6.
5. ERSLEV A., WEISS L.: În: Williams, Hematology, Ed. McGraw-Hill Book Co., 1983, 75—97.
6. FURTH R. van: Hematopoietic Growth Factors, Ed. Karger, 1992.
7. HAMBURGER R., BRAULT P., HOYA P.: Presse méd., 1994.
8. HILLMAN R.: Red Cell Manual. Ed. Davis Comp., Philadelphia, 1985.
9. KAUSCHANSKY K., KARPLUS A.: Blood, 1993, 82, 11, 3229—3240.

9a. LUX S., WOLFE S.: Pediatric Clinic, 1980, 27, 2.

10. SEBAAHOUN G., MARANINCHI D.: Méd. ter., 1980, 223, 23.
11. THORUP O.: Hematology. Ed. Saunders, Philadelphia, 1987.
12. TÖRÖK-STORLE B.: Blood, 1988, 72, 374.
13. VÂLCU A.: Eritrocitul. Edit. Medicală, Bucureşti, 1976.

IV

METABOLISMUL FIERULUI

N. MUNTEANU

Conținutul în fier al organismului uman este de aproximativ 50—55 mg/kg corp la bărbat și 35—40 mg/kg corp la femeie. Deși este în cantitate foarte mică, el se găsește răspândit în toate celulele organismului, unde participă la toate procesele biologice esențiale (20, 39).

Dependența tuturor formelor de viață de existența fierului este corelată de ușurința cu care el se reduce și se oxidează ca și de faptul că se află în cantități abundente în natură (sol, apă, lumea vegetală și animală) (20,39).

Fierul nu există însă liber în organism, ci este componentul unor substanțe care asigură transportul oxigenului și procesele oxidative. Dintre acestea, hemoglobina conține cea mai mare cantitate și este prima substanță care scade când cantitatea de fier din organism devine deficitară.

CANTITATEA TOTALĂ DE FIER — COMPARTIMENTELE FIZIOLOGICE ALE FIERULUI — NATURA CHIMICĂ

Cantitatea totală de fier a organismului uman este între 4 și 5 g. În raport cu caracterele chimice și funcționale, ca și după distribuția topografică, fierul se află în organism în patru mari compartimente: hemoglobina, compartimentul de transport, compartimentul de depozit și fierul tisular (fig. IV.1) (20, 39). Unii cercetători adaugă acestora încă două compartimente: cel labil („*pool*"-ul labil), discutabil, și mioglobina, care poate fi înglobată fierului tisular (20, 37).

În organism fierul se află sub două forme organice:

a) compuși în care fierul este legat de un nucleu porfirinic, formând gruparea „*hem*", care la rândul său se atașează de o proteină spe-

cifică; fierul din acești compuși este denumit *„fier heminic"* (hemoglobina, mioglobina, enzimele cu fier) și

b) compuși în care fierul este legat de o proteină (gruparea hem lipsește) și este denumit *„fier neheminic"* (feritina, hemosiderina, transferina) (20, 39).

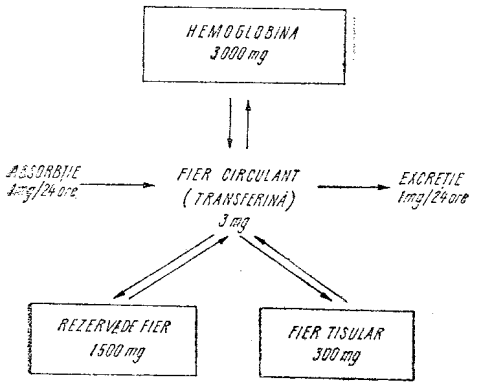


Fig. IV.1. — Compartimentele fiziologice ale fierului.

Acestei diferențe chimice îi corespunde una fiziologică: compușii heminici sunt implicați în procesele oxidative și respiratorii, iar cei neheminici asigură transportul și depozitarea fierului (20, 39).

În tabelul 4.I sunt prezentați compușii cu fier din organismul uman.

BALANȚA FIERULUI

La subiectul normal conținutul total al fierului tinde să rămână fix sau în limite foarte apropiate de valorile normale. Aceasta înseamnă că pierderile de fier trebuie compensate prin absorbția fierului din alimentație (14, 40).

Metabolismul fierului se deosebește fundamental de cel al altor substanțe, în sensul că nu are de fapt un pol excretor prin care produșii finali de degradare să fie eliminați, întrucât aceștia nu includ fier. Fierul se pierde din organism în cantități infime, de 1—2 mg pe zi, prin descuamarea epiteliilor tractului digestiv și pe cale urinară (0,05 mg/zi), iar la femei se adaugă ciclul menstrual. La bărbat și la femeia fără menstre pierderea este de 1 mg/zi, la femeile care au ciclu menstrual de 2 mg/zi, iar la gravide de 3 ori mai mare (din cauza transferului de fier către făt) (14, 20, 40).

În situații normale *pierderile fiziologice de fier* sunt compensate de *absorbția* de fier la nivelul intestinului subțire, proces adaptabil în caz de creștere a pierderilor.

Astfel se poate concepe o *„balanță a fierului"* sau un *„echilibru"*, care este *„controlată exclusiv de absorbția fierului"* (14, 20). Acest proces asigură cantitatea totală a fierului din corpul uman, ca și cantitatea constantă din compartimentele fiziologice. După absorbție fierul intră într-un ciclu metabolic care include mai întâi transportul la țesuturile ce îl folosesc (măduva osoasă, țesuturi, depozite etc.), unde este supus unor combinații biochimice complexe care îl transformă în substanțe cu activitate biologică specifică. Dacă *„balanța fierului"* reprezintă un proces fiziologic sensibil, caracteristic metabolismului fierului, controlat de absorbția lui, absența unui pol excretor este compensată de o altă particularitate a metabolismului fierului, și anume de existența unor *depozite de fier*, cu o valoare cantitativ foarte semnificativă, care sunt capabile

și ele pe lângă absorbție să asigure necesitățile de fier ale organismului în situații diferite (14, 20, 40).

Absorbția fierului (fig. IV.2) are loc în porțiunea proximală a intestinului subțire. În condiții fiziologice, ea este în medie de 1 mg/24 de ore (reprezentând 5—10% din fierul alimentar), compensând pierderile zilnice tot de 1 mg/24 de ore (14, 39, 40).

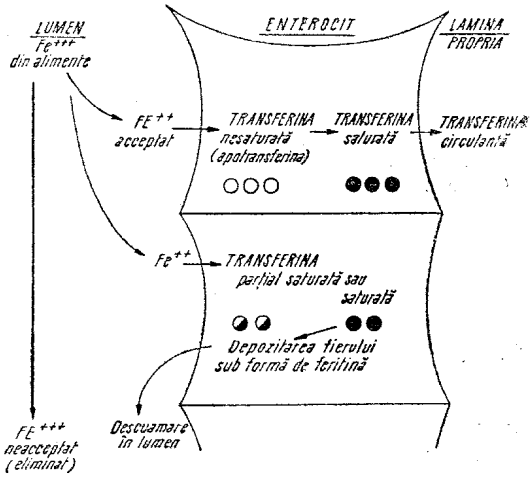


Fig. IV.2. — Mecanismul absorbției fierului prin mucoasa intestinală (reprezentare schematică).
Transferina intestinală joacă rolul important atât de receptor pe vilozități, cât și de transportor până la *lamina propria*.
Fierul acceptat (Fe^{++}) poate întâlni 2 situații: 1. Transferina intestinală nesaturată și atunci este cedat transferinei circulante. 2. Transferina intestinală saturată este depozitată ca feritină și eliminată cu descuamarea intestinală.

Pentru diferite categorii de vârstă cu particularități fiziologice, cum ar fi copiii, femeile în perioada menstruală, în perioada de sarcină, cantitățile de fier absorbit sunt mai mari (tabelul 4.II) (20, 39, 40).

Fierul din alimentație este sursa comună de fier pentru absorbția fiziologică. Rația alimentară obișnuită conține în medie 10—30 mg Fe/24 de ore sau 6 mg/1 000 de calorii. La aceste cantități se poate adăuga fierul din vasele în care se pregătesc alimentele, dacă acestea au în compoziție fier. Acesta este legat de aminoacizi (32, 51).

Mecanismul absorbției este diferit pentru fierul neheminic și cel heminic, care se găsește în cantități apreciabile în produsele alimentare din carne. Fierul neheminic este fier feric care se reduce în ioni feroși prin intermediul unor factori luminali. Fierul heminic (hemoglobină, mioglobină, enzime cu fier) suferă inițial o expunere la acidul și proteazele sucului gastric care eliberează hemul de suportul proteic, iar fierul bivalent este oxidat (devine trivalent) și se formează un produs denumit *„hemină"* sau *„hematină"*, un hem ce conține fier trivalent. Molecula de hemină intră în celula intestinală, unde fierul este eliberat din nucleul protoporfirinei, de către hemoxigenază, după care urmează calea obișnuită de absorbție (11, 20).

Există numeroși *factori intraluminali* care influențează absorbția fierului feric, formă sub care se află în alimente. Astfel, *secreția gastrică* este importantă deoarece stabilizează fierul ionic și previne precipitarea sa ca hidroxid de fier insolubil, care de obicei este indusă de substanțe chelante cum sunt aminoacizii și ketozaharurile (25). Gastro-

TABELUL 4.I

Substanțe organice care conțin fier: cantitate, localizare, funcții

Compuși	Cantitatea de fier (g)	% din fierul total	Localizare	Funcții
I. *Compuși cu fier heminic:*				
Hemoglobină	2,67	66,7	eritrocite	transportă ogixenul
Mioglobină	0,14	3,3	mușchi	respirație tisulară, rezervă
Enzime heminice: Citocrom c	0,0034	0,08	toate	respirație tisulară
Catalază	0,0045	0,11	celulele	
Peroxidază				
II. *Compuși cu fier neheminic:*				
Transferină	0,003	0,07	plasmă	transportă fierul
Feritină, Hemosiderină	1,2—1,5	30,0	depozite macrofage	reglează absorbția, rezervă
Fier total pentru un adult de 70 kg	4,0			

TABELUL 4.II

Cantitățile de fier necesare pentru diferite grupe de vârstă

Grupa de vârstă	Cantitatea de fier absorbit/mg/zi	Cantitatea de fier în rația alimentară zilnică
Sugari	1	10
Copii mici	0,5	5
Fete în perioada de creștere plus menstre	2	20
Femeia gravidă	3	30
Bărbați și femei postmenopauză	1	10

ferina, o proteină din sucul gastric, poate lega fierul alimentar în exces și preveni o rată crescută a absorbției lui (20, 27). Există însă unele substanțe venite odată cu alimentele și care favorizează formarea de ioni feroși și menținerea lor ca atare: acidul ascorbic, cisteina, alcoolul etilic în cantități mici, calciul, fructoza, sorbitolul, piruvatul și succinatul (20, 32).

Alte substanțe scad rata de absorbție a fierului: fosfații, oxalații, fitații, citrații, acidul acetic. Acestea formează cu fierul complexe insolubile (20, 39).

Mecanismul absorbției fierului prin celula intestinală la polul vascular este controversat. Trecerea fierului ionic prin mucoasa intestinală este un proces activ ce necesită consum de energie. Trecerea are loc în două etape: a) preluarea fierului intraluminal sub formă de ioni feroși (Fe^{++}) este efectuată de către receptorii pentru fier ai mucoasei intestinale (34, 35) și b) transferul ionului feros la *lamina propria,* polul vascular, unde este preluat de către transferină (3, 20, 34, 35).

Preluarea fierului de către receptorii pentru fier ai celulelor „în perie" se face rapid prin endocitoză, în următoarele ore el fiind întâlnit în reticulul endoplasmatic al celulei intestinale sub formă de complexe organice cu greutate moleculară mică sau legat de o *„proteină similară transferinei"*, denumită *„transferina celulei intestinale"* (29, 43). O mare parte din fierul absorbit este transportat la polul vascular, unde este preluat de transferină, care, cu ajutorul ceruloplasminei legate de cupru și care acționează ca o feroxidază, îl transformă în fier trivalent (ion feric), îl menține legat și îl transportă la măduva osoasă (29). Absorbția fierului la nivelul celulei intestinale este reglată în funcție de necesitățile fiziologice expuse mai sus. Nu se cunoaște precis acest mecanism al *„inteligenței mucoasei"* care este absorbția în caz de deficit de fier și o oprește sau reduce, când depozitele sunt încărcate (29, 34, 35). Fierul care nu a fost transportat la polul vascular și predat transferinei este captat de apoferitina celulei intestinale și transformat în feritină, care se elimină în lumenul intestinal odată cu descuamarea fiziologică a mucoasei (34, 35).

S-au elaborat numeroase teorii asupra mecanismului absorbției.

Teoria blocului mucoasei (Granick, 1954) atribuie rolul esențial, în reglarea absorbției fierului, apoferitinei din celula intestinală. Când aceasta nu este saturată, absorbția fierului ar crește și invers (20, 35).

Teoria fierului mesager (Crosby) are în vedere, de asemenea, rolul important al conținutului în fier al celulei intestinale (11, 35). Teoria susține că în cursul formării (regenerării) mucoasei intestinale este încorporată în celulă și o cantitate de fier exogen, care de fapt ar reflecta situația depozitelor de fier ale organismului. Dacă depozitele sunt mari, absorbția din lumen încetează. Dacă sunt mici, captarea se face rapid și fierul trece aproape direct spre polul vascular prin celulă. Feritina este găsită, în mod normal, în celula intestinală la nivelul *„corpilor F"* din citoplasmă (35).

Numeroase cercetări mai noi au demonstrat rolul esențial jucat în absorbția fierului și în reglarea sa de către *„transferina specială a celulei intestinale"* (20, 43). Saturarea transferinei celulare împiedică o

continuare a absorbției și invers. Dacă totuși fierul se absoarbe, el este captat și fixat de apoferitină și eliminat odată cu descuamarea celulelor intestinale (43). Reglarea absorbției fierului pare sigur modulată de transferina și apoferitina celulelor intestinale. Acest mecanism funcționează în condiții fiziologice, când concentrația de fier în lumen nu depășește cotele din alimentația normală (20, 43). Mecanismul de reglare poate fi depășit de ingestia de fier accidentală la copii, sau în situații când în ratia alimentară se află cantități excesive de fier. În aceste situații, mecanismul de blocare devine ineficient și rata de trecere a fierului în sânge crește mult (20, 39).

În afara reglării absorbției de către factorii din lumenul intestinal și din celula intestinală, mai există și alți factori din afara tubului digestiv (35, 43), cum sunt: starea depozitelor de fier, rata eritropoiezei, hipoxia, gradul anemiei, care influențează absorbția, dar nu se cunoaște mecanismul de acțiune (6, 20, 35).

Gradul de saturare a transferinei în fier, concentrația fierului seric, rata de *clearance* a fierului plasmatic și concentrația de eritropoietină au fost de asemenea considerate ca mesageri umorali ai mucoasei intestinale pentru reglarea absorbției fierului (20, 35).

Se pare că mucoasa intestinală are capacitatea de a răspunde mai multor mecanisme umorale (35). Recent a fost subliniat rolul reglator în absorbția fierului al schimburilor de fier între plasmă și celule. Probabilitatea ca o moleculă de transferină circulantă să primească un atom de fier este proporțională cu *turnover*-ul fierului plasmatic și al fierului total. Deoarece fierul total este reflectat de depozite, rolul acestora în absorbție pare astfel confirmat (20, 25, 35).

În figura 4.2 este expusă schematic absorbția fierului la nivelul mucoasei intestinale.

CICLUL FIERULUI

Metabolismul fierului este dominat de rolul său în sinteza hemoglobinei. În acest proces fierul este utilizat în permanență, deoarece zilnic se sintetizează și se distrug 8 g Hb. Astfel, fierul circulă în compartimentele sale fiziologice permanent, iar mișcările sale pot fi descrise ca un „*ciclu*", deoarece, așa cum s-a menționat, nu există un pol pentru excreția sa. În centrul acestui ciclu se află compartimentul fierului plasmatic de dimensiuni reduse, dar cu un rol esențial, deoarece prin intermediul său se fac schimburile cu țesuturile care folosesc fierul pentru formarea unor compuși biologici.

Fierul absorbit este fixat de transferină, care îl transportă la măduva osoasă, unde este utilizat pentru sinteza celor 8 g de Hb/24 de ore, care necesită 30 mg fier (39). Fierul hemoglobinei este redat circulației prin eritrocitele circulante, a căror masă totală conține aproximativ 2—3 g fier. După circa 120 de zile eritrocitele sunt captate de macrofage, care eliberează fierul din hemoglobină și îl depun sub formă de feritină sau hemosiderină, dar cea mai mare parte este redată imediat transferinei, care îl va transporta din nou la măduvă pentru sinteza hemoglobinei sau în țesuturi pentru formarea enzimelor cu hem, închizând ciclul. Din toată cantitatea de aproximativ 30 mg fier cât circulă în

plasmă zilnic, doar 2 mg intră în ficat și alte țesuturi, restul este utilizat pentru sinteza hemoglobinei (39).

Ciclul fierului cuprinde așadar următoarele etape: *transportul fierului în plasmă, mișcarea fierului la nivelul lichidelor interstițiale și intracelulare („pool-ul labil"), metabolismul fierului în eritroblaști și depozitarea fierului* (fig. IV.3).

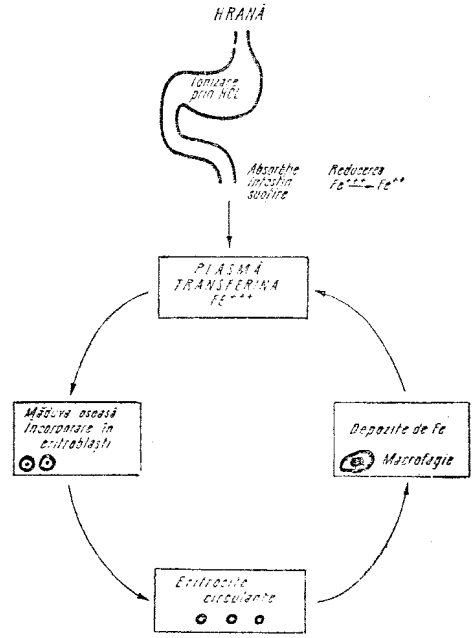


Fig. IV.3. — Ciclul fierului la omul normal.

Transportul fierului. Odată intrat în plasmă, un atom de fier va circula și va rămâne într-un sistem închis, fiind reciclat între plasmă și eritroblaști, continuându-se cu eritrocitele circulante, macrofage, de unde revine în plasmă.

În plasmă fierul circulă în cea mai mare parte fixat de transferină.

Transferina sau siderofilina este proteina specifică ce fixează fierul în sânge. Ea este o beta-1-globulină, cu o greutate moleculară de 74 000—81 000. Cu ajutorul electroforezei în gel s-a putut demonstra un număr de 19 variante genetice de transferină, care diferă între ele prin secvența aminoacizilor (26). Transmiterea genetică este autosomală și toate variantele au aceeași funcție. Sinteza transferinei are loc în cea mai mare parte în ficat și în macrofage, țesutul limfoid, glandele salivare, glanda mamară, ovare, testicule (16, 19, 25, 39). Cu ajutorul ^{131}I s-a demonstrat distribuția sa egală în plasmă și spațiul extravascular (26). Durata de viață este de 10 zile, iar concentrația plasmatică este de 250 mg/dl. În condiții fiziologice transferina fixează 100 μg fier/dl sau 18μmol/dl, ceea ce în mod curent este denumit *„concentrația fierului seric"*, *„sideremie"* sau *„fier circulant"*. Capacitatea totală a transferinei de fixare a fierului este de 300 μg/dl sau 56 μmol/dl. Saturația transferinei este normal doar de 30%, denumită curent și *„coeficient de saturație"*. Restul până la 100% care reprezintă diferența între fierul circulant și capacitatea totală de fixare a fierului este denumită *„capacitatea latentă de fixare a fierului"* și are valoarea de 200 μg/dl (8, 16, 25, 39, 41).

Concentrația fierului seric depinde de conținutul total în fier al organismului, în special de umplerea depozitelor de fier, de aportul și de pierderea de fier. În stare metabolică normală, valorile fierului plasmatic se mențin cvasiconstante și sunt independente de aportul alimentar, dar prezintă o variație în cursul ritmului circadian, fiind cu 10—20% mai ridicate dimineața, față de seară.

Valorile fierului seric sunt crescute în anemiile hemolitice și în hemocromatoză și scăzute în anemiile feriprive, în cazurile de eritro-

poieză regenerativă, după hemoragii acute, sau în faza de regenerare, după administrarea de vitamină B_{12} în anemia Biermer, precum și în inflamațiile acute și cronice.

În fig. IV.4 sunt redate valorile fierului plasmatic și a capacității de fixare a fierului în diferite afecțiuni. Singura afecțiune în care crește

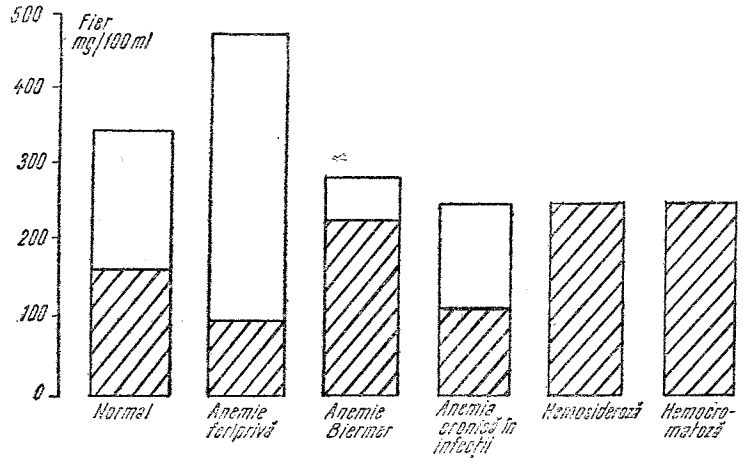


Fig. IV.4. — Variațiile sideremiei, transferinei și capacității latente de saturare la normal și în diferite afecțiuni

— În anemia feriprivă, sideremia joasă, dar există o creștere importantă a transferinei, de aceea capacitatea latentă este mult crescută.

— În anemia cronică din infecții, transferina este moderat redusă, sideremia este joasă, iar capacitatea latentă este normală sau subnormală.

— În hemocromatoză și hemosideroză, sideremia este mult crescută, iar transferina este redusă și complet saturată, capacitatea latentă nulă.

— Anemia Biermer se caracterizează prin hipersideremie cu capacitate latentă redusă.

capacitatea totală de fixare a fierului este anemia feriprivă, iar în condiții fiziologice, în sarcină (25, 41).

O moleculă de transferină leagă 2 atomi de fier trivalent, ceea ce corespunde la 1,25 μg fier pentru 1 mg transferină (25, 26). Cei 2 atomi de fier se leagă pe locuri diferite, separate spațial, ce diferă între ele fizicochimic (25).

Afinitatea sa pentru fier este foarte mare, fiind de fapt unul din cei mai importanți chelanți de fier. Fletscher și Huehns au propus 2 locusuri de legare a fierului de transferină: *„locusul A"*, care furnizează fierul normoblaștilor și placentei și preia fierul nou absorbit din intestinul subțire, și *„locusul B"*, care eliberează fier ficatului și depozitelor de fier (25).

Locusul genei transferinei se află pe cromosomul 3 și este aproape de locusul genei pentru receptorul de pe eritroblast pentru transferină (44).

Fiecare capăt al moleculei de transferină conține o moleculă de sialoproteină, care reprezintă sediul locusurilor unde se leagă cei 2 atomi de

fier. Atomul de fier se fixează prin intermediul unui ion bicarbonic (25, 26).

Metabolismul fierului la nivelul și în interiorul eritroblaștilor din măduva osoasă (utilizarea fierului în eritropoieză). Rolul important al transferinei este de a transporta fierul la eritroblaștii măduvei osoase în interiorul cărora se sintetizează hemoglobina.

Cedarea fierului de către transferină eritroblaștilor parcurge 4 etape:
— fixarea transferinei pe receptorii de membrană;
— trecerea prin membrană folosind pinocitoza;
— cedarea fierului către mitocondrii și
— reîntoarcerea transferinei în plasmă.

Legarea transferinei de membrana eritroblaștilor este un proces temporar, pasiv, determinat de forțe electrostatice. Eritroblaștii posedă numărul cel mai mare de receptori pentru transferină (peste 300 000 pe celulă), iar reticulocitul, unde sinteza Hb este aproape terminată, mai poate fixa încă până la 50 000 de molecule de transferină/minut (4, 17, 25).

Traversarea membranei eritroblastului se face prin endocitoza complexului de transferină-receptor. Înainte de endocitoză, complexul *„transferină ferică-receptor transferină"* (46) formează o mică proeminență într-o mică depresiune pe membrană. Urmează formarea unei vezicule, constituită din complexul transferină-receptor, care este învelită într-o membrană alcătuită din proteine cu greutatea între 47 000 și 180 000 daltoni (23, 25, 33, 45). Aceste vezicule fuzează cu endosomii, unde are loc procesul de acidifiere în vederea eliberării fierului de pe transferină, pentru a fi cedat mitocondriei (23, 25, 33, 38).

Procesul de endocitoză a receptorului de transferină de pe membrana eritroblastului are loc continuu, indiferent dacă transferina a fost sau nu legată de receptorul transferinei (23, 25, 34, 44, 46).

Acidifierea, care are loc în vezicule, disociază un atom de fier din transferina diferică, iar celălalt atom este eliberat prin ajutorul ATP (17, 23, 33, 44). Apotransferina ce rezultă rămâne fixată de receptor și este readusă cu acesta înapoi la suprafața eritroblastului, unde, la pH neutru, este eliberată, devenind disponibilă pentru un alt ciclu de fixare-eliberare a fierului.

Procesul impune transformarea Fe^{+++} în fier bivalent (Fe^{++}) ce va fi introdus în protoporfirina formată în mitocondrie (23, 44).

Receptorul de transferină este o glicoproteină de 90 000 de daltoni. Conține o secvență de 760 de aminoacizi în lungime și este alcătuită din 2 subunități, legate prin legături de sulfid (45). Face parte așadar din proteinele ce alcătuiesc membrana eritrocitară în care N-terminal este situat pe partea citoplasmatică a membranei, iar C-terminal pe suprafața sa externă (12, 17, 21, 23, 45).

Sinteza receptorilor de membrană este controlată genetic, iar locusul genei se află pe brațul lung al cromosomului 3, lângă cel al transferinei (31). În prezent, prin metode ce sunt expuse la capitolul de genetică moleculară, se cunoaște și structura ARN mesager al receptorului de transferină ce conține 5 sau mai multe anse sau segmente scurte de nucleotide (CUGUGX) în porțiunea 3 (12, 31, 45).

Sinteza receptorului de transferină este indusă de către deficitul de fier și este inhibată de hemul sintetizat (38). Rata de sinteză a recepto-

rului este, de asemenea, controlată genetic, locusul genei fiind situat în regiunea 5 din ARN mesager al genei ce controlează sinteza receptorului (12, 31, 45).

Gena ce controlează sinteza receptorului de transferină a fost clonată, iar structura sa este bine cunoscută (31, 45). Reglarea balanței fierului în eritroblast este legată chiar de situația fierului din celulă, așa cum s-a menționat, care transmite informațiile necesare (deficit sau cantitate crescută) la nivelul aparatului genetic care controlează sinteza feritinei și a receptorului pentru transferină. Mesajul este transmis în zonele ce răspund și controlează sinteza acestor elemente (inclusiv în ARNm netradus) (31).

Importanța transferinei în eliberarea fierului către eritroblast este subliniată de două observații semnificative: 1) când transferina este complet saturată în fier, fierul care se mai absoarbe prin intestin este depozitat în ficat (hemocromatoză); 2) când transferina este absentă congenital (atransferinemia congenitală), fierul care se absoarbe prin intestin se acumulează în ficat, pancreas, splină etc., aportul la măduvă fiind nesemnificativ, ceea ce induce o anemie hipocromă, microcitară severă.

Transferul de fier direct din macrofage eritroblaștilor prin fenomenul denumit *„rofeocitoză"*, descris de Bessis, nu este recunoscut unanim de cercetători (32).

Cantități relativ mici de fier sunt transportate la alte țesuturi pentru sinteza enzimelor cu fier și a mioglobinei.

Metabolismul fierului în interiorul eritroblastului. În eritroblast, fierul urmează două căi: cedarea sa către mitocondrie, unde este încorporat pe cale enzimatică în protoporfirină pentru a forma hemul și formarea împreună cu apoferitina a feritinei.

Cedarea către mitocondrie a fierului este punctul terminus al călătoriei transferinei legate de fier, deoarece mitocondria este sediul sintezei hemului, adică a legării fierului bivalent cu inelul protoporfirinei. Modul în care fierul intră în mitocondrie nu este pe deplin elucidat. În prezent se știe că până la 90% din fierul ce intră în eritroblast este preluat de mitocondrie pentru sinteza hemului. Restul nefolosit este transferat citoplasmei, unde este preluat de către apoferitină și formează granulele de feritină caracteristice sideroblastului normal (20, 35).

Se pare că preluarea fierului de către mitocondrie se face și prin medierea altor compuși cu greutate moleculară mică, cum ar fi ATP, ADP, citratul de fier, sucroza și unele nucleotide, care joacă un rol intermediar între transferina care le cedează fierul și mitocondrie. Cuprul (sau enzimele ce conțin cuprul) este, de asemenea, un element esențial pentru transferul fierului către mitocondrie (38, 52).

Primul pas este legarea pasivă a transferinei legate cu fier sau a compușilor cu fier de greutate moleculară mică de un loc nespecific pe membrana mitocondrială externă (38, 49, 52). După ce s-a eliberat de substanța transportoare, fierul se leagă pasiv de un loc cu specificitate mare pe membrana internă a mitocondriei. Trecerea fierului trivalent în formă feroasă (bivalent), aptă pentru a se lega de protoporfirină, se face rapid prin citocrom c, NADH sau citocromoxidază, etapă dependentă de energie, care activează respirația mitocondrială (23, 38, 49, 52).

În final, ionul feros trece și de membrana internă a mitocondriei și se leagă în matricea mitocondrială, prin legături cu greutate moleculară mare, de care este însă eliberat rapid când sinteza protoporfirinei s-a terminat (23, 38, 49, 52). De fapt, ambele procese sunt sincrone (38, 52). Existența de fier ionic în mitocondrie este o realitate demonstrată în anemiile sideroblastice, unde reducerea sintezei protoporfirinei, provocată de deficite enzimatice etc., lasă acest fier ionic în exces în mitocondrie după care are loc organizarea sa în micelii feruginoase ce constituie substratul biochimic al sideroblaștilor patologici *„inelari"*, stigmat morfologic al anemiilor sideroblastice (39).

Feritina joacă un rol secundar în eritroblast, în acest proces. Apoferitina din citoplasmă, proteină sferică constituită din 24 de subunități ce delimitează o cavitate centrală, fixează în cavitatea sa centrală fierul ce nu a fost folosit și formează granule de feritină care, la microscopia electronică apar învelite de o membrană, denumite siderosomi (sideroblaștii normali) (39).

Fierul din feritină nu mai este însă disponibil pentru eritropoieză, iar celula poate arunca aceste granule de feritină în citoplasmă.

Fierul în sistemul monocitomacrofagic (depozitele de fier ale organismului). Cantitatea de fier din macrofage, curent denumit *„fierul de depozit"*, are valori cuprinse între 1 și 1,5 g. Fierul se află în aceste depozite sub 2 forme chimice: feritina și hemosiderina.

La sfârșitul duratei lor de viață, eritrocitele sunt înglobate în macrofage, unde fierul este oxidat în formă trivalentă formând methemoglobina, din care el se desface foarte repede de globină. Ulterior, din hemină el este eliberat complet prin heminoxigenază (47).

Pentru a înțelege sensul și mecanismele prin care depozitele de fier satisfac nevoile de fier ale organismului pentru eritropoieză în special, este util a se cunoaște structura biochimică a celor două proteine cu fier ce le compun.

Feritina care reprezintă forma de depozitare fiziologică a fierului, este un complex solubil de hidroxid de fier și o proteină specifică, apoferitina. Aceasta formează un înveliș al moleculei de feritină, în interiorul căreia se găsesc ioni ferici, ioni hidroxil și oxigen, dispersați sub forma unui grătar (plase). Miezul cristalin al feritinei este format din oxihidroxid feric (FeOOH), cu cantități mici de fosfat aflat în zonele neregulate ale cristalului de oxihidroxid feric. Interiorul acestui înveliș de apoferitină poate fixa aproximativ 4 300 de molecule de FeOOH cristaline, care conțin în total 2 000 de atomi de fier (7, 10, 18, 22). Feritina conține circa 20% fier. Când este maxim saturată cu fier o moleculă de feritină are 800 000 de daltoni și conține 31% fier. Apoferitina are un diametru extern de 130 Å, iar cavitatea are un diametru intern de 70 Å; greutatea ei moleculară este de 441 000 de daltoni. Apoferitina este compusă din 24 de subunități similare sau identice. O moleculă de feritină seamănă cu un cub cu marginile rotunjite. Fiecare fațetă a cubului este alcătuită din 4 monomeri de apoferitină și are un por de 10 Å diametru, prin care fierul și alte molecule mici intră sau părăsesc cavitatea inferioară a feritinei (18). Monomerii de apoferitină au greutatea moleculară considerată grea (H) de 21 000 de daltoni sau ușoară (L) de 18 500 (1, 18); învelișul de apoferitină constă dintr-o mixtură de mono-

meri ușori și grei. Monomerul ușor conține 174 de aminoacizi, cel greu 182 (7, 18).

Fiecare monomer este compus dintr-un lanț proteic cu patru segmente paralele lungi, ce au aspectul de baghetă, desemnate ABCD și două segmente scurte E și P. Aceste segmente scurte căptușesc fiecare por și par a fi locul unde se efectuează legarea atomului Fe bivalent și oxidarea lui, care intră apoi în interior.

Secvența aminoacizilor din monomerii de apoferitină, atât a lanțurilor grele, cât și a celor ușoare, este bine cunoscută în prezent. De asemenea, se cunosc și locusurile genei ce comandă sinteza apoferitinei: pentru monomerii H și L, ele sunt situate pe cromosomii 11 și 19. Distribuția reziduurilor hidrofilice în structura monomerilor poate influența aviditatea lor pentru fier. Monomerii L posedă 15 structuri hidrofilice care pot fixa fierul, în timp ce monomerii H nu au decât șapte (13, 18).

Monomerii H contribuie totuși la legarea fierului în porul intermonomeric. Apoferitina bogată în monomeri H fixează fierul mai repede, dar îl reține mai puțin timp decât apoferitina, care conține mai mulți monomeri L. De asemenea, *turnover*-ul fierului din monomerii L este mult mai lent decât în monomerii H, în concordanță cu funcția monomerilor L de a reține fierul timp mai îndelungat. Depozitele de fier din ficat și splină sunt formate din feritină cu mulți monomeri de tip L (18, 22, 48).

Preluarea, fixarea și eliberarea fierului din feritină este rapidă. Molecula de apoferitină acționează ca o feroxidază, deoarece leagă și oxidează fierul bivalent ce îi este adus de transferină și îl depune sub formă de cristale de oxihidroxid feric (FeOOH) în miezul central care crește astfel progresiv (2, 22, 42).

Fenomenul invers, de eliberare a fierului, este mediat de substanțe cu greutate moleculară mică, de tipul flavin mononucleotid, de acidul ascorbic și alte molecule mici ce pot trece prin porii de 10 Å. Desferioxamina, chelant de fier, poate, de asemenea, trece ușor prin porii feritinei (22, 24, 42).

Există numeroase isoferitine a căror structură conține diferite combinații de monomeri H și L (22, 50).

Monomerii de apoferitină în interiorul celulelor care conțin feritină (altele decât macrofagele) sunt sintetizați de către ribosomii celulei respective, care sunt stimulați de prezența fierului din celula respectivă. Pe ribosomi există regiuni active de ARN mesager al feritinei, cum ar fi ansa de nucleotide CAGUGX (unde X pot fi C, A, GU), structură care se află pe regiunea 5 a ARNm netradus, care este sensibilă la fier și la substanțe ce leagă fierul (13, 18, 22). Prezența fierului declanșează procesul de sinteză a apoferitinei, prin traducerea ARNm al feritinei preformate și translocația lui la poliribosomi, care în acest mod vor sintetiza apoferitina (13, 18). Procesul este invers în absența fierului; astfel, existența unei substanțe proteice izolate ce leagă fierul, ca de exemplu apoferitina, inhibă elementul sensibil, adică ansa de nucleotide menționată mai sus (13, 18).

Sinteza feritinei mai poate fi redusă când structura ansei de nucleotide este modificată din diferite motive (mutații etc.) (13, 18).

Feritina se află virtual în toate celulele și în lichidul interstițial al țesuturilor organismului. Hepatocitele și alte celule posedă receptori pentru feritină, care favorizează pătrunderea acesteia în interiorul celulelor (18, 22, 30, 42).

Feritina serică este în jur de 69 μg/l pentru bărbat și 35 μg/l pentru femeie și se corelează fidel cu situația depozitelor de fier, fiind un indicator deosebit în diagnosticul anemiilor hipocrome (2, 5, 9, 42).

Agregate de feritină sunt vizibile cu microscopul optic în eritroblaști pe frotiuri de măduvă, colorate cu albastru de Prusia.

Hemosiderina, un alt component al depozitelor de fier, este prevalentă în macrofagele din splină, ficat și măduvă. În condiții patologice (de exemplu, în hemocromatoză), se acumulează în cantități mari (28, 42, 48).

Hemosiderina are structură chimică similară cu cea a feritinei, dar cea fizicochimică diferă, în sensul că învelișul proteic de apoferitină al moleculei de hemosiderină este dezgolit („despuiat"), format din polimeri de apoferitină de dimensiuni foarte diferite, ceea ce a făcut să se afirme că hemosiderina conține o *„apoferitină degenerată"* (48).

Consecința acestei diferențe fiziochimice este că hemosiderina este insolubilă în apă și se colorează ușor cu albastru de Prusia — în timp ce feritina este solubilă și este mai greu colorabilă cu reactivul menționat (18, 48).

Pe de altă parte, deoarece în hemosiderină suportul proteic se denaturează și se pierde, conținutul în fier este mai mare la hemosiderină, și anume de 29 ±8%, în timp ce la feritină este între 16 și 23%. Chiar și conținutul în fier al hemosiderinei își schimbă structura fiziochimică prin formarea de agregate de Fe_2O_3 (18, 22, 48).

Procesul de denaturare al feritinei are loc în lisosomii macrofagelor, care fagocitează eritrocitele și unde sunt denaturate mitocondrii și fierul coloidal exogen (48). Astfel, hemosiderina este un amestec de feritină denaturată cu alte materiale ce conțin fier (48). Ea este practic o *„proteină cu fier de depozit"*, mai stabilă și mai puțin furnizoare de fier pentru necesitățile eritropoiezei în comparație cu feritina (18, 22, 28, 48).

Fierul din feritină se poate ușor mobiliza, în timp ce eliberarea fierului din hemosiderină se face mai încet.

Hemosiderina se poate vedea și la microscop, fără o colorare specifică prealabilă, sub forma unor mici grămezi gălbui refractile (28).

Fiziologia depozitelor de fier. Umplerea depozitelor de fier este dependentă de nevoile măduvei osoase și de absorbția fierului. Ele sunt mai reduse fiziologic la copil din luna a 4-a până în al doilea an și la femeie față de bărbat. Macrofagele au rolul de a degrada hemoglobina provenită din eritrocitele senescente și a pune la dispoziția organismului materialele componente pentru refolosirea lor (24, 36). Procesul are loc rapid și aproximativ 20% din fierul acestor eritrocite fagocitate este eliberat în câteva ore. Acest fier este cedat imediat transferinei circulante pentru nevoile eritropoiezei. De altfel, 80% din fierul transportat zilnic de transferină la țesuturile ce consumă fier, în mod special la măduva osoasă pentru nevoile eritropoiezei, provine din fierul acestor eritrocite degradate în macrofage, deci din depozitele de fier, deoarece

fierul absorbit la nivelul intestinului subțire este în cantități foarte reduse și insuficiente nevoilor fiziologice (24, 36).

Rata reutilizării fierului din eritrocitele distruse în macrofage este în medie de 40% la 12 zile (adică 40% din fierul acestor eritrocite apare în eritrocitele nou-formate la 12 zile).

Rata reutilizării oscilează însă între 16 și 69%. Restul fierului (80—30%) provenit din degradarea eritrocitelor intră în depozite ca feritină sau hemosiderină. La subiecții normali, 40% din acest fier se mai află încă în depozite și după 140 de zile, ceea ce demonstrează că rata de reînnoire a acestui fier restant din depozit este foarte lentă. Totuși, dacă nevoile eritropoiezei cresc, acest fier poate fi și el mobilizat rapid (22, 36).

În prezența unor procese maligne sau inflamatorii, fierul provenit din degradarea eritrocitelor este și mai lent folosit, deci are o reînnoire și mai lentă, motiv pentru care depozitele de fier din macrofage cresc atât de mult în aceste boli (22, 36).

Eliberarea fierului din depozite, respectiv din feritină, are loc prin intermediul unor agenți reductori: tioglicolatul, cisteina, ascorbatul, bicarbonații, citrații, lactații (22, 36).

Cel mai important mediator fiziologic este flavin-mononucleotidul redus, care eliberează fierul din feritină. Fierul eliberat este ion feros și în această stare traversează citoplasma și membrana macrofagului și în plasmă este preluat de transferină și oxidat de ceruloplasmină, care are un rol de feroxidază.

Depozitele de fier din sistemul macrofagic controlează absorbția fierului, dar reglează și concentrația transferinei; macrofagele pot sintetiza apotransferina și, de asemenea, pot prelua și degrada transferina circulantă legată de fier (22, 36). În mod esențial, depozitele de fier constituie un mecanism de siguranță în aprovizionarea cu fier în oricare situație la care poate fi supusă eritropoieza (22, 28, 36).

Mioglobina este structural similară hemoglobinei, dar are o structură monomerică. O moleculă de mioglobină conține un grup hem înconjurat de un lanț lung de polipeptide, cu 150 de aminoacizi, dispus sub formă de anse. Are o greutate moleculară de 17 000 de daltoni și conține 0,34% fier.

Este conținută în mușchi, inclusiv miocard și funcționează ca un rezervor de oxigen când celula suferă prin lipsa acestuia.

Pool-ul de fier labil este un alt compartiment fiziologic care a fost conceput de Pollycove, care a observat că, după injectarea ^{59}Fe, o parte se reîntoarce în plasmă, reflux care provoacă o deflexiune a curbei *clearance*-ului fierului plasmatic, la 1—2 zile de la injectarea ^{59}Fe (37).

Acest compartiment fiziologic ar fi, după Pollycove, constituit din fierul care a părăsit plasma și a ajuns în lichidele interstițiale sau la nivelul membranelor celulare și care are o valoare de 80—90 mg de fier. Cantitatea neutilizată revine în plasmă. Acest compartiment nu este admis de mulți cercetători în acest domeniu (20).

Fierul tisular este alcătuit din enzimele ce conțin fier, răspândite în toate celulele, cum ar fi citocromul c, citocromoxidaza, catalazele, peroxidazele etc. Valoarea sa este de 6—8 mg (20, 39).

Acest compartiment de fier, deşi în cantităţi foarte reduse, poate fi modificat în deficitul de fier, fiind răspunzător de o simptomatologie caracteristică a carenţei de fier: oboseala, astenia, nervozitatea etc.

Rolul enzimelor cu fier în respiraţia celulară este bine cunoscut.

Pierderile de fier fiziologice sunt reduse, aproape nesemnificative: 1 mg/24 ore, deci 1/1 000—1/1 500 din cantitatea totală de fier din organism. El este recuperat prin absorbţie. Fierul se pierde prin exfolierea tegumentelor, fecale, urină, fanere şi extrem de puţin prin transpiraţie (39, 47).

La femei, în perioada menstruală, se pierd în medie 2 mg fier/zi (39, 47).

Ferokinetica. Mişcarea fierului în spaţiile sale fiziologice poate fi estimată cu ajutorul trasorilor radioactivi, în particular cu ^{59}Fe. Se foloseşte în practică marcarea *in vitro* a siderofilinei,, prin incubarea unui volum de plasmă proaspătă de 10 ml cu ^{59}Fe. Doza de izotop trebuie să fie suficientă pentru a permite măsurătorile necesare. De aceea se utilizează 1 microcurie de ^{59}Fe pentru fiecare 3 kg de greutate corporală (37).

Cunoaşterea ferokineticii permite obţinerea următoarelor informaţii: *clearance-ul* ^{59}Fe, *turnover*-ul fierului plasmatic şi al celui eritrocitar, procentul de încorporare a ^{59}Fe în eritrocite, timpul de tranzit medular al ^{59}Fe (37, 39) (vezi capitolul Investigaţii cu izotopi în hematologie).

Pe lângă calculul acestor indicatori preţioşi ai activităţii eritropoietice, utilizarea ^{59}Fe mai permite măsurarea radioactivităţii, prin citiri externe, la nivelul organelor implicate în metabolismul fierului: măduvă osoasă, ficat, splină şi cord (37).

Cercetarea ferokinetică este utilă în practică pentru a defini tipul de anemie. De exemplu, în anemia aplastică, *turnover*-ul fierului plasmatic este normal sau redus moderat, în schimb *turnover*-ul eritrocitar şi indicele de utilizare a fierului sunt mult reduse. Fierul este dirijat în ficat şi reţinut acolo (37, 39).

În anemiile hemolitice, eritropoieza este accelerată, *turnover*-ul fierului plasmatic şi eritrocitar sunt mult crescute, utilizarea este normală, iar fierul se acumulează în locurile de distrugere a eritrocitelor (splină, ficat).

În anemiile cu ineficienţă a eritropoiezei (anemiile sideroblastice, anemiile megaloblastice etc.), *turnover*-ul fierului plasmatic este crescut, în schimb cel eritrocitar este redus, iar indicele de utilizare a fierului este mult scăzut.

În practica clinică, cercetarea ferokinetică se aplică numai în situaţiile neclare, în determinarea tipului de anemie, sau în cele în care anemia este cauzată de mecanisme combinate (hemoliză asociată cu ineficienţa eritropoietică etc.) (37, 39, 47).

Măsurătorile ferokinetice trebuie considerate cu oarecare aproximaţie. Calculele indicilor ferokinetici menţionaţi mai sus se bazează pe supoziţia că fierul părăseşte plasma cu o rată exponenţială. În realitate, înregistrările din primele ore arată o reîntoarcere în plasmă a 35% din fierul care a părăsit-o („refluxul fierului"). Pollycove a încercat să explice acest fenomen prin existenţa unui *„pool labil"* de fier între plasmă

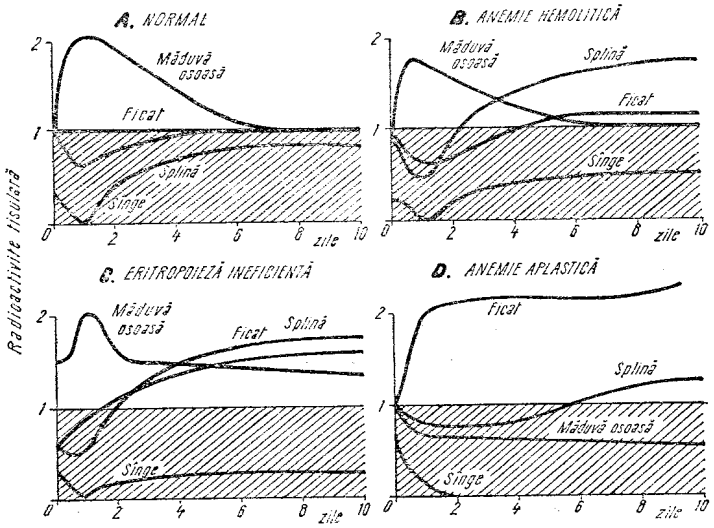


Fig. IV.5. — Măsurători radioactive ale unor organe implicate în metabolismul fierului în diferite anemii.

TABELUL 4.III

Date de ferokinetică la subiectul normal și în diferite tipuri de anemie

Subiectul	*Clearance* 59 Fe (minute)	*Turnover* fier plasmatic (mg/zi/dl)	*Turnover* fier eritrocite	Indice de utilizare a fierului (%)
Normal	86	0,7 total 26 mg/24 ore	0,56	80—100
Anemia aplastică	încetinit 267	redus 0,45	redus 0,10	redus 23
Anemia hemolitică	rapid 20	accelerat 3,42	accelerat 1,87	moderat scăzut sau normal 60
Anemii prin eritropoieză ineficace	rapid 20	accelerat 8,87	accelerat 1,24	foarte redus 16
Anemia feriprivă	normal sau rapid 40	accelerat 5,89	accelerat 1,53	normal 80

și eritrocite, cu o valoare de 80 mg. Nu s-a putut demonstra existența sa de către alte cercetări și explicația acceptată este că acest reflux ar reprezenta schimbul de transferină cu spațiul extravascular (37).

Corectarea indicilor în funcție de acest reflux nu se face în practica clinică, ci numai în cercetările de fiziologie.

În fig. IV.5 sunt prezentate aspecte caracteristice ale măsurătorilor radioactive ale organelor implicate în metabolismul fierului, în diferite tipuri de anemii.

De asemenea, în tabelul 4.III sunt expuse date de ferokinetică, caracteristice diferitelor tipuri de anemie.

BIBLIOGRAFIE

1. ARBUSTINI E. și colab.: Am. J. Card. 1991; 68 (11): 1233.
2. BAKKER J., BOYER R. T.: J. Biol. Chem. 1986; 261: 13128.
3. BAYER-LUX M. J.: Am. J. Clin. Nutr. 1991; 54 (3): 607.
4. BAYNES R. D. și colab.: Am. J. Haem. 1987; 24: 417.
5. BODEMAN H. H. și colab.: Blut 1985; 51: 25.
6. BUYS S. și colab.: Blood 1991; 78: 3288.
7. BOYD D. și colab.: J. Biol. Chem. 1985; 260: 1755.
8. CAZOLLA M. și colab.: Blood 1985; 66: 935.
9. CAZOLLA M. și colab.: Br. J. Haem. 1986; 62: 209.
10. CHARACHE S. și colab.: Am. J. Cl. Lab. 1987; 88: 33.
11. CONRAD M. E. și colab.: J. Clin. Med. 1987; 110: 418.
12. CHITAMBAR C. R. și colab.: Blood 1991; 78 (9): 2444.
13. CRAGG S. și colab.: Human Gen. 1985; 71: 108.
14. CROSBY H. W.: Blood 1963; 22: 441.
15. DAVIS A. E. și colab.: Lancet 1962; 2: 6.
16. DIEJA A. și colab.: Blood 1993; 81 (4): 1046.
17. DAUTRY-VERSANT A.: Biochem. 1986; 68: 375.
18. DÖRNER M. H. și colab.: Proc. Nat. Ac. Sci. 1985; 82: 3139.
19. FARGION S. și colab.: Blood 1991; 78 (9): 2444.
20. FINCH A. C., HUEBERS H. A.: N.E.J. Med. 1982; 306 (25): 1520.
21. GROSS H. J.: Blut 1985; 51: 117.
22. HARRISON P. M. și colab.: J. Inorg. Biochem 1986; 27: 287.
23. HRADILEK A. și colab.: Biomed. Biochem. Acta 1987; 46: 141.
24. HUARANI F. și colab.: Moll. Coll. Biochem. 1990; 95: 49.
25. HUEBERS H. A., FINCH A. C.: Blood 1984; 64: 763.
26. INVERNIZZI R., CAZOLLA M. și colab.: Br. J. Haem. 1990; 76: 427.
27. JACOBS A.: Lancet 1968; 1: 1313.
28. KRAUSE R. J. și colab.: Am. J. Clin. Path. 1979; 72: 68.
29. MORLEY C. G. și colab.: Int. J. Biochem. 1985; 17: 553.
30. MOROZ C.: Clin. Chim. Acta 1985; 148: 111.
31. MÜLLER E. W. și colab.: Cell 1988; 53: 815.
32. MUNTEANU N.: Metabolismul fierului. În: St. Berceanu (sub red.): Hematologia Clinică, Edit. Medicală, București, 1977, 85.
33. PAN B. T. și colab.: J. Cell. Biol. 1985, 101: 942.
34. PARMLEV R. T. și colab.: Br. J. Haem. 1985; 60: 81.
35. PEPPRIEL I. și colab.: Blood 1982; 60: 635.
36. PINTAR J. și colab.: Blood 1982; 59: 110.
37. POLLYCOVE M., MORTIMER K.: J. Clin. Invest. 1961; 40: 763.
38. PONKA P. S., SCHULMAN M. H.: Blood 1985; 65: 210.
39. POPESCU R. E.: Metabolismul fierului. Edit. Medicală, București, 1958.
40. REFSUN S. B. și colab.: Sc. J. Gastrology 1984; 19: 867.
41. RUSSO DI S. și colab.: Blood 1985; 66: 1445.
42. SARAY A. K. și colab.: Am. J. Clin. Path. 1985; 84: 103.
43. SAVIN M., COOK I.: Blood 1980; 56: 1029.
44. SHIH S. Y și colab.: Blood 1993; 81 (1): 234.

45. SCHNEIDER C., WILLIAM J. C.: J. Cell. Sci. 1985; 3: 139.
46. THATE S. H. şi colab.: Blood 1988; 72 (5): 1693.
47. VEVERA V.: Fiziopatologia fierului. Edit. Medicală, Bucureşti, 1978.
48. WEIR M. P. şi colab.: J. Clin. Path. 1985; 38: 915.
49. WEAVER J. şi colab.: Biochem. J. 1990; 265: 415.
50. WESSELIUS L. J. şi colab.: Am. Rev. Resp. Dis. 1992; 145 (1): 311.
51. WRETLIND A.: Iron deficiency. Academic Press, 1970, 39.
52. YOUNG S. P. şi colab.: Biochem. J. 1985; 232: 819.

V

METABOLISMUL ENZIMOENERGETIC AL ERITROCITULUI

ILIE MARCU

Rolul principal al eritrocitelor este de a asigura transportul oxigenului de la nivelul alveolelor pulmonare la țesuturi și de a evacua, tot prin aparatul respirator, bioxidul de carbon care rezultă din arderile tisulare.

Pentru ca eritrocitul să poată îndeplini această funcție fundamentală în economia generală a organismului trebuie să existe anumite condiții minimale, și anume: 1) menținerea fierului heminic sub forma sa bivalentă (Fe^{2+}), singura care permite fixarea reversibilă a moleculei de oxigen (O_2); 2) asigurarea unei concentrații reduse de ioni de sodiu în interiorul celulei, în condițiile unui gradient plasmatic foarte înalt de sodiu; 3) conservarea formei de disc biconcav, care permite eritrocitului să traverseze zonele vasculare cu dimensiuni reduse, inclusiv unele capilare al căror diametru este mai mic decât cel eritrocitar; 4) menținerea unui potențial reducător (sub forma unor grupări chimic active, în special de tipul sulfhidril), cu rol în protejarea hemoglobinei și a enzimelor intraeritrocitare atât față de protențialul oxidant reprezentat de oxigenul transportat, cât și față de unele substanțe (medicamente și altele) cu care eritrocitul poate intra în contact.

Pentru asigurarea acestor condiții bazale, eritrocitele au nevoie de energie, care le este accesibilă sub forma grupărilor macroergice (adenozin trifosfat — ATP) rezultate din metabolizarea glucozei, care reprezintă principalul lor substrat metabolic. Energia permite desfășurarea normală a funcțiilor eritrocitare, activitatea pompelor ionice pentru sodiu și potasiu, a funcțiilor enzimatice, precum și conservarea formei discoidale prin menținerea structurilor membranei.

Cantitatea de energie de care are nevoie eritrocitul este foarte redusă și rezultă din metabolizarea glucozei; pot fi utilizate și alte surse,

cum ar fi galactoza, fructoza și manoza, dar nu și sucroza, lactoza sau maltoza, care nu pot traversa membrana eritrocitară.

Intrarea glucozei în eritrocit se face rapid, printr-un proces numit „difuziune facilitată", care nu necesită energie și nu este influențat de insulină. Ritmul de intrare în eritrocit a glucozei din mediu este cu mult mai înalt decât rata de utilizare a acesteia, rată care este considerată ca fiind cea mai redusă din toate sistemele celulare ale organismului. Pentru comparare, menționăm faptul că leucocitele au o rată de utilizare a glucozei de 500 de ori mai ridicată. Cantitatea de glucoză consumată de eritrocite este de 1—2 mmol glucoză pe oră, pentru un litru de celule. Considerând masa eritrocitară ca având circa 3 litri, consumul total de glucoză în 24 de ore se ridică la numai 15—25 g glucoză.

Unele ipoteze susțin că în membrana eritrocitară ar exista un mecanism care asigură transportul glucozei prin membrană. Acest mecanism, despre a cărui structură nu se cunosc date precise, s-ar afla la nivelul zonelor de discontinuitate ale membranei lipidice. Transportul ipotetic s-ar combina reversibil cu glucoza pe care o eliberează apoi în interiorul celulei.

Degradarea glucozei, care în eritrocite se desfășoară în proporție de 90—95% prin intermediul căii metabolice Embden-Mayerhof (glicoliza anaerobă), asigură eliberarea a 2—3 moli de ATP pentru un mol de glucoză consumată, suficient pentru a acoperi necesitățile energetice ale celulei.

Întreruperea alimentării cu energie prin reducerea dincolo de o anumită limită a activității unor sisteme enzimatice sau creșterea necesităților energetice ca o consecință a unei suprasolicitări oxidative (cum este cazul ingestiei de substanțe oxidante) pot determina hemoliza eritrocitelor sau inactivarea hemoglobinei ca urmare a transformării acesteia în methemoglobină.

Eritrocitul este o celulă morfologic rudimentară, fiind lipsit de nucleu, ca și de mitocondrii, ribosomi, aparat Golgi sau lisosomi, pierduți în cursul maturării ei. Este singura celulă din organism care poate funcționa fără sistem citocromic.

Deși o celulă rudimentară, eritrocitul trebuie să facă față, în cursul celor aproximativ 120 de zile de viață în care parcurge multe mii de kilometri prin aparatul circulator, unor solicitări mecanice extreme. Pe de altă parte, oxigenul pe care-l transportă reprezintă o agresiune permanentă, potențialul oxidativ pe care-l reprezintă oxigenul fiind unul din factorii cei mai agresivi cu care poate fi confruntată o celulă. De asemenea, factorii de pH, densitatea ionilor de sodiu etc. constituie tot atâtea condiții nefavorabile cărora eritrocitul trebuie să le opună sisteme de apărare eficiente.

Marea flexibilitate funcțională a acestei celule poate fi explicată prin aceea că ea părăsește măduva hematoformatoare înzestrată cu un echipament enzimatic complet, care îi va asigura obținerea energiei prin degradarea glucozei și o capacitate reducătoare care va permite protejarea hemoglobinei.

Enzimele eritrocitare, odată deteriorate, nu mai pot fi înlocuite cu molecule noi, deoarece eritrocitul nu dispune de aparatul necesar sintezei de proteine (nucleu și ribosomi) și aceasta duce la moartea ce-

lulei în momentul în care ea nu mai dispune de energie și de potențial reducător.

Enzimele intraeritrocitare sunt similare cu cele din majoritatea celorlalte celule, cu excepția methemoglobin-reductazei, specializată pentru protejarea hemoglobinei.

Eritrocitele adulte conțin numai urme de glicogen, fiind aproape total dependente de glucoza din mediul ambiant pentru asigurarea substratului energetic. Întreaga lor activitate este bazată pe eficiența enzimelor implicate în catabolizarea generatoare de energie a glucozei și în formarea potențialului reducător. Pentru aceasta sunt necesare prezența unui număr minim de molecule normale de enzimă, o cantitate determinată de substraturi adecvate, cofactori și inhibitori ai reacțiilor enzimatice.

Ciclul Embden-Mayerhof (E-M), principala cale de metabolizare a glucozei și de sinteză a ATP în eritrocit, se deosebește, într-o oarecare măsură, de cel întâlnit în alte celule, prin prezența unor enzime care permit sintetizarea și degradarea 2,3-difosfogliceratului (2,3-DPG), un compus ce se află în concentrație ridicată în eritrocite, și care, alături de pH-ul intracelular și de bioxidul de carbon, este esențial în modularea curbei de disociere a oxihemoglobinei. Alți doi compuși care rezultă din activitatea ciclului E—M sunt ATP și nicotinamid adenin dinucleotidul (NAD^+). Adenozin trifosfatul (ATP) este cel mai important intermediar energetic al eritrocitului, fiind implicat în trei reacții: substituirea (la nevoie) a 2,3-DPG în procesul de disociere a oxihemoglobinei, intervenție determinantă în menținerea formei și flexibilității membranei eritrocitare, și asigurarea funcționării pompelor de sodiu și potasiu, care permit transferul activ al respectivilor ioni prin membrana eritrocitară, împotriva unui gradient plasmatic deosebit de nefavorabil.

Nicotinamid adenin dinucleotidul (NAD^+) și forma sa redusă (NADH) se găsesc în cantități mici în interiorul eritrocitelor. Primul compus este coenzima gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazei (GADP), în timp de NADH este coenzima ultimei trepte a căii E—M, în care piruvatul este catalizat în lactat de către lactat dehidrogenază. NADH este esențial pentru menținerea fierului din hem în formă redusă, proces care este mediat de NADH methemoglobin reductază. Oxidarea fierului heminic în Fe^{+++} produce methemoglobină.

Catabolizarea glucozei (fig. V.1) în cadrul ciclului E—M se desfășoară după cum urmează:

O primă serie de reacții asigură fosforilarea glucozei cu ajutorul hexokinazei, fosfohexozo-izomerazei și fosfofructo-kinazei, la încheierea acestei etape glucoza fiind transformată în glucozo-6 fosfat (G-6-P), apoi în fructozo-6 fosfat (F-6-P) și în cele din urmă în fructozo-1,6 difosfat (F-1, 6-P). Fructozo-1,6 difosfatul este clivat de aldolază, prin această reacție luând naștere două molecule triozice — gliceraldehid-3-fosfat (G-3-P) și dihidroxiacetonfosfat (DHAP) — care sunt interconvertibile. Gliceraldehid-3 fosfatul este transformat în piruvat și, în cele din urmă, în lactat. Deoarece eritrocitele nu conțin compușii care asigură degradarea glucozei pe calea acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs), piruvatul nu poate fi transformat în CO_2 și, din acest motiv, eritrocitul

pierde posibilitatea de a obține o moleculă adițională de ATP. Ciclul E—M este mai puțin productiv decît ciclul oxibiotic Krebs în ceea ce privește generarea de energie.

Cu toate acestea, eritrocitul are încă o posibilitate de a obține energie suplimentară, în funcție de necesitățile sale mai mari, prin așa-

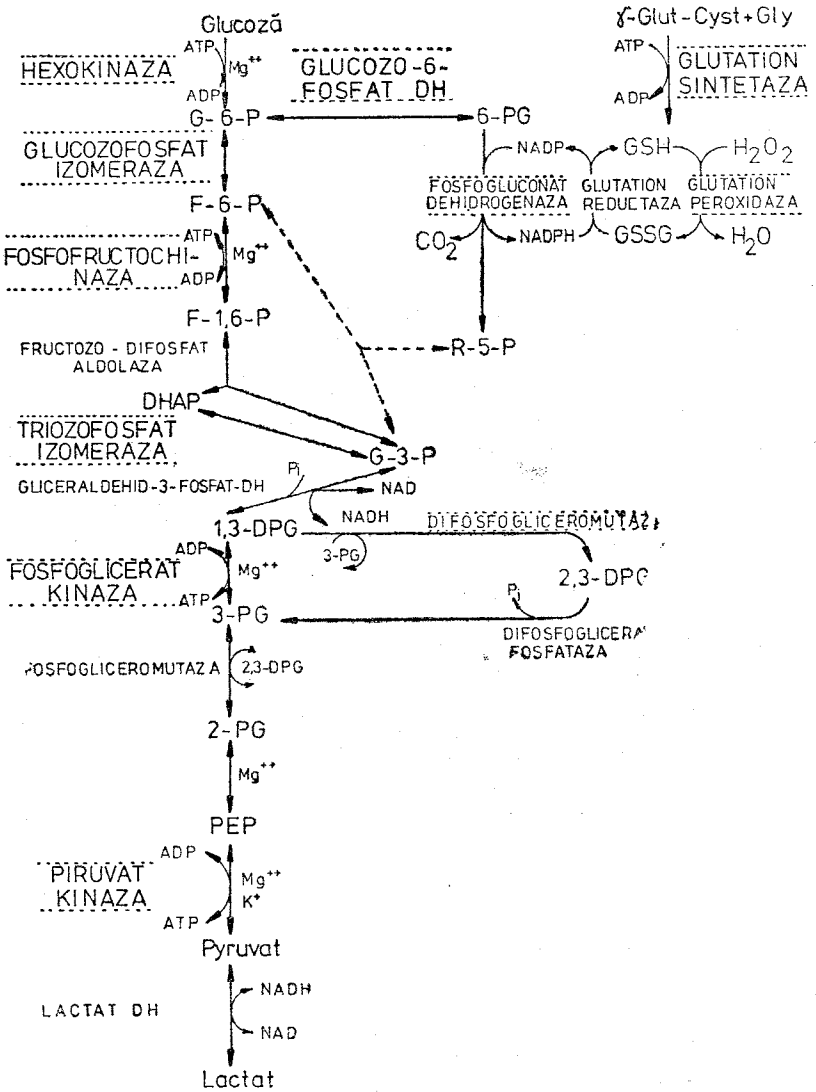


Fig. V.1. — Glicoliza anaerobă (calea Embden—Meyerhof).

numitul „ambreiaj energetic" sau calea Rappaport—Luebering (ciclul 2,3-difosfogliceratului), în care 1,3-difosfogliceratul este transformat în 3-fosfoglicerat, cu eliberarea unei molecule de ATP.

Eritrocitele, spre deosebire de alte celule, posedă o concentrație mare de 2,3-DPG, care scade afinitatea hemoglobinei pentru oxigen și permite eliberarea crescută de oxigen către țesuturi.

Produsele finale ale metabolismului glucozei — piruvatul și acidul lactic — difuzează în afara eritrocitului și sunt apoi metabolizate în alte țesuturi.

Procesele descrise ilustrează marea flexibilitate metabolică a eritrocitului, care îi permite să se adapteze la numeroase condiții funcționale nefavorabile. O cantitate redusă (5%) din glucoza intrată în eritrocit este metabolizată pe o altă cale, cunoscută sub numele de *ciclul pentozelor sau șuntul pentozomonofosfaților*. În cazul în care necesitățile celulei o cer, capacitatea de prelucrare a glucozei în cadrul acestei căi poate crește până la 20% din totalul cantității intrate în celulă. Rolul principal al ciclului pentozelor este de a genera capacitatea reducătoare necesară, în primul rând, pentru menținerea fierului heminic în formă redusă, singura capabilă să fixeze reversibil oxigenul la hemoglobină.

Cea mai importantă activitate a acestei căi metabolice o constituie, deci, reducerea NADP în NADPH, care contribuie la asigurarea unei capacități reducătoare de rezervă, esențială pentru protejarea hemoglobinei. Pentru fiecare mol de glucoză metabolizată se produc 2 moli de NADPH.

În mod secundar, pentozofosfatul care ia naștere în acest ciclu ca urmare a decarboxilării glucozei este antrenat în calea glicolizei anaerobe, unde participă la formarea de ATP.

Activitatea acestei căi metabolice este reglată de cantitatea de NADPH din eritrocit, scăderea concentrației acestuia declanșând imediat o creștere a cantității de glucoză metabolizată prin șuntul hexozomonofosfaților.

Enzimele implicate în metabolismul glucidic al eritrocitelor sunt următoarele:

— *Hexokinaza* catalizează fosforilarea glucozei în poziția 6, prima etapă în metabolizarea ei. Eritrocitele tinere conțin cantități mai mari decât cele adulte sau vârstnice. Pentru a fi eficace, hexokinaza ca și alte enzime din acest ciclu are nevoie de ioni de magneziu. G-6-P este un puternic inhibitor al hexokinazei și echilibrarea activității acestei enzime se asigură prin concentrația produsului final al reacției pe care o catalizează. Hexokinaza este formată din trei izoenzime care pot fi puse în evidență prin electroforeză în bloc de amidon. La adult se izolează două benzi, denumite I și III, și urme dintr-o a treia bandă, denumită II. Izoenzima de tip II este asociată cu hemoglobina fetală. Componenta majoră este izoenzima I, care reprezintă aproximativ 90% din totalul conținut în eritrocite. În literatura de specialitate s-au descris cel puțin șase variante ale hexokinazei, a căror prezență determină anemie hemolitică congenitală nesferocitară.

— *Triozo-fosfat izomeraza* catalizează interconversiunea celor două trioze care iau naștere sub acțiunea aldolazei. Este cea mai activă enzimă din ciclul E—M. Electroforeza permite separarea a trei izoenzime, ca și la hexokinază. S-au descris cazuri de anemie hemolitică consecutivă unei anomalii a acestei enzime.

— *Fosfoglicerokinaza* transferă fosfatul de la 1,3-difosfoglicerat la ADP și permite formarea unei molecule de ATP. Este o enzimă activă, dar cea mai mare parte a activității este legată de una din cele trei izoenzime care pot fi separate prin electroforeză.

— *Piruvat kinaza* (PK) catalizează cea de-a doua reacție, care duce la formarea unei molecule de ATP prin transferarea fosfatului de la fosfoenol piruvat la ADP într-o reacție ireversibilă. Există diferențe marcate între PK extrasă din eritrocite și cea din leucocite. Din punctul de vedere al variantelor PK ce pot determina anemii hemolitice, trebuie subliniat că deficitul de PK este, după deficitul de G-6-PD, cea mai frecventă eritroenzimopatie și cel mai bine definit și înțeles dintre deficitele care pot afecta enzimele implicate în calea E-M.

— *Glucozo-6-fosfat dehidrogenaza* este enzima-cheie care intervine în calea pentozelor, domeniu metabolic care asigură generarea potențialului reducător al eritrocitului. Această enzimă oxidează G-6-P transformându-l în 6-fosfogluconat (6-PG), reacție în cadrul căreia NADP este redus la NADPH. Este o enzimă care se găsește din abundență în eritrocite, în special în cele tinere, ca și în alte celule din organism. Enzima a fost izolată în stare pură și studiată în detaliu, fiind cunoscute numeroase izoenzime cu activități variabile, dintre care unele pot determina anemii hemolitice.

Glutationul (GSH) are o importanță particulară pentru eritrocit. Glutationul (GSH) este un tripeptid care conține sulfhidril (γ-glutamil-cisteil-glicină) sintetizat de eritrocitul matur. Rolul său este de a detoxifia peroxidul de hidrogen (H_2O_2) și alți radicali oxizi liberi (O_2^-, OH) care iau naștere spontan sau după administrarea unor medicamente cu efecte oxidante. Peroxidul de hidrogen este extrem de toxic pentru orice celulă și afectează toate structurile eritrocitare, inclusiv hemoglobina, proteinele enzimatice și pe cele din membrană, care sunt, pe de altă parte, expuse și la efectele nocive ale oxigenului transportat de eritrocit. Detoxifierea H_2O_2 se poate produce spontan, dar este intensificată de glutation-peroxidază. Glutationul, care constituie un sistem redox, are rolul de a proteja grupările sulfhidrice (SH) atât din constituția hemoglobinei, cât și din alți compuși de oxidare intraeritrocitari. În procesul de reducere a grupărilor SH oxidante, GSH suferă un proces de oxidare, transformându-se în glutation oxidat (GSSG) (fig. V.2). În cursul specializării continue a sistemelor de protecție împotriva oxidării s-a dezvoltat și o altă enzimă, glutation-reductaza, al cărui rol este de a reduce glutationul oxidat, restaurând concentrația de GSH.

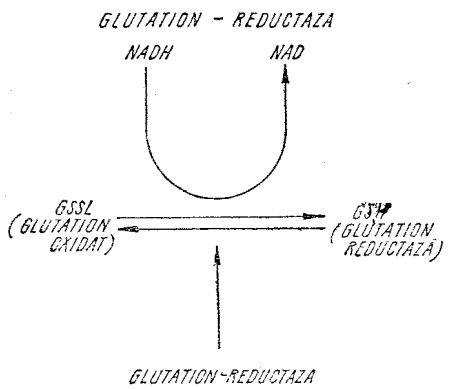


Fig. V.2. — Transformările glutationului sub influența glutation-reductazei.

În afară de GSH, eritrocitul mai conține și alte sisteme protectoare, mai strict specializate. Cel mai important dintre acestea este *sistemul*

methemoglobin-reductazei, enzimă ce asigură transformarea majorității methemoglobinei (care ia naștere prin denaturarea spontană a hemoglobinei) în forma activă a hemoglobinei, capabilă să trasporte oxigen.

Eritrocitul mai conține și alte enzime, care nu sunt direct implicate în catalizarea reacțiilor de degradare a glucozei și nici în asigurarea unui potențial reducător de protecție. Dintre acestea trebuie menționate: *anhidraza carbonică,* care contribuie la transportul oxigenului și bioxidului de carbon; *catalaza,* care intervine în procesul de descompunere al peroxidului de hidrogen în cazurile în care acesta atinge concentrații toxice; și *acetil-colinesteraza,* prezentă în cantități mari în membrana eritrocitară, dar al cărei rol nu este cunoscut.

Lipsa unor enzime eritrocitare, în special a celor cu rol în catabolizarea glucozei și în șuntul pentozelor sau înlocuirea lor cu izoenzime inactive ori, cu totul excepțional, mai active sunt cauze ale unor tulburări hemolitice de intensitate variabilă. Aceste tulburări sunt transmisibile ereditar.

Aproximativ 30% din totalul energiei generate prin catabolizarea glucozei se consumă pentru asigurarea funcționării „pompelor ionice" de sodiu și potasiu, mecanisme biochimice care asigură menținerea, în interiorul eritrocitelor, a unui nivel redus de ioni de sodiu (14 mmol) și a unui nivel ridicat de ioni de potasiu, împotriva unui gradient ionic invers din mediul plasmatic, unde sodiul se găsește în concentrație de 10—15 ori mai mare, iar potasiul în concentrație de 20—30 de ori mai mică. Pompele ionice sunt localizate la nivelul unor pori din membrana eritrocitelor și numeroase cercetări au reușit să identifice trei tipuri de astfel de pompe: IA, IB și II. Primele două sunt dependente de ATP pentru funcționare și sunt inhibate de ouabaină, în timp ce pompa de tip II este inhibată de acidul etacrinic. Aceste pompe mai au, probabil, și capacitatea de a exclude din eritrocite ionii de calciu, de asemenea împotriva unui gradient plasmatic invers.

Formarea ATP din ADP are loc, după unii autori, chiar în membrana eritrocitară, în apropierea situsurilor în care sunt amplasate pompele ionice, ceea ce ar facilita mult alimentarea lor cu energie. Aceasta presupune în același timp că enzimele implicate în metabolizarea glucozei sunt și ele legate de membrana eritrocitară.

S-a observat că adăugarea de ATP la mediul în care sunt suspendate eritrocitele în timpul conservării lor (conservare în cursul căreia multe din eritrocite suferă un proces de sfericizare) determină recuperarea formei de disc biconcav a eritrocitelor, în ciuda faptului că ATP nu poate traversa membrana acestor celule. S-a tras concluzia că în structura membranei eritrocitare ar fi încorporată o proteină contractilă, similară cu cea din fibrele musculare, care ar fi sensibilă la ATP. În absența ATP, membrana eritrocitară devine rigidă, iar pompele ionice devin incapabile să mai elimine sodiul sau calciul, ceea ce duce la pierderea capacității eritrocitelor de a traversa teritorii vasculare capilare, la fixarea eritrocitelor rigide în sinusoidele splenice și la distrugerea lor (tabelul 5.I).

Rolul lipidelor în structura și activitatea membranei eritrocitare. Deși eritrocitele mature nu au capacitatea de a sintetiza lipide, tot așa cum sunt incapabile să sintetizeze proteine, membrana eritrocitară, în a

cărei structură intră o cantitate substanțială de colesterol și alte lipide, prezintă un grad considerabil de mobilitate biochimică în ceea ce privește compușii lipidici.

Colesterolul asigură membranei o mai mare fluiditate și are un rol important în determinarea dimensiunilor acesteia. Alte lipide din mem-

TABELUL 5.I

Concentrațiile compușilor din ciclul glicolitic Embden-Meyerhof în eritrocite
(după Beutler, 1975)

Compusul	Concentrație*
G-6-P	2,8±0,75
F-6-P	0,9±0,2
F-1,6-P	0,2±0,1
DHAP	0,94±0,3
2,3-DPG	368,0±56,0
3-PG	4,5±0,5
2-PG	0,73±0,2
PEP	1,2±0,1
Piruvat	5,3±2,1
ATP	127,0±9,0
ADP	19,0±3,0
AMP	1,8±0,3

* Toate valorile sunt exprimate în micromoli per 100 ml de eritrocite și reprezintă valorile medii ± deviația standard.

brană sunt fosfolipidele și acestea includ fosfatidil-serina, lecitina și cefalina. Ele joacă un rol important în structurarea straturilor care compun membrana eritrocitară și îi conferă proprietăți speciale de deformabilitate și flexibilitate.

Între plasmă și eritrocite are loc un schimb important de fosfolipide, aproximativ 60% din totalul fosfolipidelor din membrana eritrocitară fiind înlocuite într-un interval de cinci zile.

Conținutul în colesterol al membranei variază cu vârsta celulelor, fiind mai ridicat la cele tinere. *Turnover*-ul colesterolului din membrană este foarte rapid, de numai câteva ore, și se desfășoară fără consum de energie.

Colesterolul, împreună cu spectrina (proteină omogenă, hidrosolubilă, cu marcate proprietăți elastice, reprezentând circa 20% din totalul proteinelor membranei, localizată la nivelul suprafeței interne a membranei) joacă un rol esențial în determinarea și menținerea proprietății specifice a eritrocitelor de a suferi deformări reversibile (tabelul 5.II).

Un corolar de o deosebită importanță al metabolismului eritrocitelor este marea flexibilitate a membranei eritrocitare.

Raportul suprafață/volum al eritrocitelor este relativ mare, ceea ce permite acestor celule să sufere modificări extrem de variate ale formei lor, fără ca acestea să fie însoțite de variații ale volumului sau suprafeței; deformarea poartă numele de *isocorică* și este reversibilă. Membrana eritrocitară nu este deosebit de elastică, dar din cauza compoziției sale are o fluiditate care îi asigură o mare capacitate de defor-

mare, fără de care nu ar putea supraviețui, deoarece viața acestei celule este un interminabil șir de agresiuni mecanice. O mare parte a celor 120 de zile de viață, eritrocitele o petrec în teritorii vasculare în care vasele pe care trebuie să le traverseze au diametre uneori mai mici de 3 milimicroni. Faptul este posibil datorită proprietăților reologice

TABELUL 5.II

Lipidele din membrana eritrocitară*

Colesterol liber	20%
Colesterol esterificat	2%
Acizi grași liberi	3%
Glicosfingolipide neutre	12%
Gangliozide	5%
Fosfatidil colină	20%
Sfingomielină	15%
Fosfatidil etanolamină	15%
Fosfatidil serină	5%
Lizolecitină	5%

* Valorile sunt exprimate în procente din greutatea uscată.

specifice ale eritrocitelor, ca deformabilitatea, orientarea stabilă în timpul parcurgerii capilarului și rotirea membranei în jurul propriei sale soluții de hemoglobină („efectul de șenilă"). În trecerea prin astfel de vase, eritrocitele își pot dubla valoarea diametrului, atingând până la 14 microni, fără să se producă fenomene de liză și fiind capabile să recupereze aproape instantaneu forma inițială. Eritrocitele patologice pierd, printre altele, și capacitatea de deformare, fiind mai ușor reținute și distruse în sinusoidele splenice. Cu timpul, eritrocitele încep să sufere un proces de îmbătrânire, corelat îndeaproape cu o scădere a activităților enzimelor eritrocitare și consecința ei metabolică. Rezultă progresiv o scădere a glicolizei și a sintezei ATP și, consecutiv, o reducere a potențialelor redox, ceea ce are ca efect final o denaturare oxidativă a proteinelor eritrocitare și o lezare a membranei celulare al cărei conținut în acizi grași, fosfolipide și colesterol diminuează treptat. Volumul eritrocitelor și rezistența lor osmotică și mecanică scad concomitent.

BIBLIOGRAFIE

1. AEBI H., SUTER H.: GLUTATIONE. L. FLOHE, H. BENÖHR, H. SIES, H. D. WALLER, A. WENDELL (eds.). EDIT G.: Thieme, Stuttgart, 1974.
2. ALBRECHT V., ROIGAS H., SCHULTZE M., JACOBASCH G., RAPPAPORT S.: Eur. J. Biochem. 1971; 20: 44.
3. ASHWORTH L. A. E., GREEN C.: Biochem. Biophys. Acta 1964, 84: 182.
4. ASTRUP P., GARBY L., DEVERDIER C. H.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968; 22: 171.
5. BAAR S.: Brit. Haematol. 1976; 34: 69.
6. BARCLAY R.: Med. Lab. Sci. 1985; 42: 166.
7. BEUTLER E., MATSUMOTO F., GUINTO E.: Experientia 1974; 30: 190.
8. BOLIS L., HOFFMAN J. F., LEAF A.: Membranes and Disease. Raven Press, New York, 1976.

9. BREWER G. J.: În Surgenor D. M. (ed.): The Red Blood Cell: Academic Press. New York, 1974.
10. BREWER G. J.: Red Cell. Metabolism and Function: Plenum Press, New York, 1970.
11. COOPER R. A.: Semin. Haematol 1970; 7: 296.
12. DAVIDSON W. D., TANAKA K. R.: Brit. J. Haematol. 1973; 23: 371.
13. EGGLESTONE L. V., KREBS H. A.: Biochem J. 1974; 138: 425.
14. EDEM O. B.: Brit. Med. Bull. 1986; 42: 191.
15. ELGSAETER A., STOKKE B. T., MIKKELSEN A., BRANTON D.: Science 1986; 234: 1217.
16. GAETANI G. F. și colab.: Brit. J. Haematol. 1979; 43: 39.
17. O'GRADY J. G. și colab.: Brit. J. Haematol. 1984; 57: 441.
18. GRIMES A. J.: Red Cell Metabolism: Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1980.
19. GUIDOTTI G.: Arch. Intern. Med. 1972; 129: 194.
20. HALLAM C., WHITTAM R.: Proc. Roy. Soc., Series B 1977; 198: 109.
21. HARRISON R., LUNT G. G.: Biological Membranes: Their Structure and Function: Halsted Press, New York, 1976.
22. KUCZMARSKI C. A. și colab.: Vox Sang 1987; 52: 36.
23. LACELLE P. L.: Blood Cells 1975; 1: 269.
24. LEE J. Y. și colab.: Am. J. Haematol. 1987; 26: 27.
25. LORAND L., SIEFRING G. E., LOWE-KRENTZ L.: Semin. Haematol. 1979; 16: 65.
26. MOROFF G. și colab.: Transfusion 1982; 24: 115.
27. PALEK J.: Blood Rev. 1987; 1: 146.
28. RAPPAPORT S.: În Greenwalt T. J., Jamiesson G. A. (eds.): The Human Red Cell in Vitro, Edit. Grune and Stratton, New York, 1974.
29. TRUONG H. T. N.: Blood 1986; 67: 214.
30. WEBSTER N. R., TOOTHILL C.: Acta Haematol. 1986; 75: 30.
31. WYNGARDEN B. J., SMITH H. L. Jr., BENNETT J. C. (eds.): Cecil Textbook of Medicine, 19 edition, vol. I. W. B. Saunders Co., Philadelphia, Londra, 1993.

VI

HEMOGLOBINELE NORMALE
Structură, sinteză, funcţie

C. PREDESCU

Hemoglobina (Hb) reprezintă elementul esenţial pentru principala funcţie fiziologică a globulului roşu — funcţia respiratorie. Ea reprezintă 95% din proteinele solubile ale eritrocitului şi 35% din greutatea totală a acestuia. Eritrocitul poate fi asemănat, astfel, cu o soluţie concentrată de hemoglobină conţinută într-o membrană lipoproteică. Se apreciază că în fiecare eritrocit se găsesc aproximativ 300 de milioane de molecule de hemoglobină.

Structura chimică. Hemoglobina este o cromoproteidă porfirinică care conţine fier, în structura sa intrând o parte proteică — *globina* — şi o parte prostetică — *hemul*. Greutatea moleculară a hemoglobinei este de aproximativ 64 000 de daltoni, întreaga moleculă putând fi considerată ca o asociere de 4 monomeri, în structura cărora intră un lanţ polipeptidic şi o grupare hem, având fiecare o greutate moleculară de 16 000 de daltoni. Hemul are o culoare roşie pe care o imprimă întregii molecule de hemoglobină şi este, din punct de vedere chimic, o feroprotoporfirină IX, în care atomul de fier este situat în centrul inelului porfirinic. Fierul se găseşte sub formă bivalentă (Fe^{2+} — fier feros) şi este legat hexacoordinativ în cadrul moleculei de Hb. Prin patru dintre aceste legături, fierul se leagă de cei patru atomi de azot ai inelului tetrapirolic, iar prin celelalte două legături se asigură contactul cu componenta proteică a Hb. Structura chimică a hemului este constantă în diverse hemoglobine şi nu se cunosc variante structurale condiţionate genetic. Prin proprietatea sa de a se fixa reversibil cu oxigenul, hemul constituie partea fiziologic activă din molecula de hemoglobină.

Partea proteică — globina — este un tetramer format din patru lanţuri polipeptidice, două câte două identice, cele două perechi de lanţuri deosebindu-se între ele prin numărul şi secvenţa de aminoacizi (structura primară). Globina diferă ca structură de la o hemoglobină la alta,

ea imprimând specificitate diverselor hemoglobine cunoscute. Au fost identificate 6 tipuri de lanțuri polipeptidice: ζ, ε, α, γ, δ și β, ce intră în structura globinei din hemoglobinele fiziologice. Structura primară a lanțurilor α, γ, δ și β este în prezent bine cunoscută: lanțurile α și ζ au în structură 141 de aminoacizi, iar lanțurile ε, γ, δ și β câte 146 de aminoacizi. Lanțurile de aminoacizi, pe o întindere de aproximativ 75% au o structură secundară spațială de tip α-helicoidal, întreruptă la anumite intervale de regiuni nehelicoidale, care determină îndoirea și încolăcirea catenei. Structura terțiară apare astfel ca legătură spațială a celor 8 regiuni helicoidale (notate cu literele A—H) în cadrul aceluiași lanț (în lanțul α lipsește helixul D). Structura cuaternară este reprezentată de tetramerul alcătuit din două dimere $\alpha\beta$ care este menținut prin legături necovalente între lanțul α al unui dimer cu un lanț non-α al celuilalt dimer. Fiecare din cele 4 lanțuri polipeptidice din structura hemoglobinei are atașată o grupare hem, situată la exteriorul moleculei, într-o cavitate denumită „buzunarul hemului" ce este realizată în cadrul structurii terțiare a fiecărui lanț.

Legarea hemului de globină se face prin intermediul nucleului imidazolic al histidinei din pozițiile 92 și 63 pentru lanțurile β și, respectiv, 87 și 58 pentru lanțurile α. Inelul imidazolic al histidinei din poziția β 92 (respectiv α 87) se leagă direct de atomul de fier, prin una din legăturile coordinative ale acestuia, în timp ce cel din poziția β63 (respectiv α 58) se leagă indirect printr-o legătură de hidrogen realizată prin intermediul unei molecule de apă. Această legătură labilă permite, în forma oxigenată a hemoglobinei, legarea O_2 de atomul de Fe^{2+}. În plus, între hem și globină mai există și alte legături: legături polare, între radicalii acid propionic din pozițiile 6 și 7 ale protoporfirinei și grupările aminice din lanțurile polipeptidice; legături Van der Waals între grupările metilice și vinilice ale hemului și unii acizi din lanțul polipeptidic. Aminoacizii situați la nivelul și în vecinătatea legării hemului de globină sunt invariabili în tot regnul animal, fapt ce sugerează că această structură (fig. VI.1.) este esențială pentru funcția de transportor de O_2 a Hb. Hemoglobinele anormale, cu modificări structurale situate la acest nivel, sunt caracterizate prin alterări importante atât ale stabilității moleculare, cât și ale proprietăților funcționale.

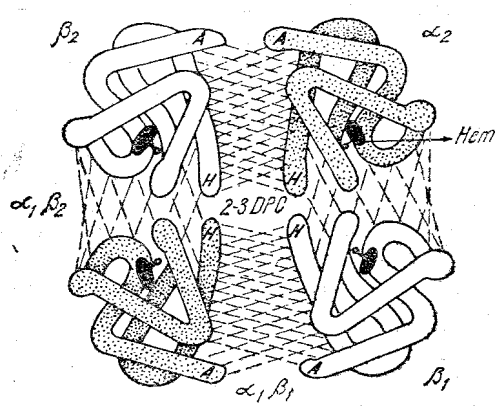


Fig. VI.1. — Structura hemoglobinei.

În cadrul structurii complexe tridimensionale a tetramerului de hemoglobină, ce conține 574 de aminoacizi și 4 grupări hem, cu o formă sferoidală de 64 Å×55 Å×50 Å, cele 4 lanțuri componente stabilesc legături intercatenare (structura cuaternară), deosebit de importante în menținerea structurii și funcției normale a hemoglobinei.

Sinteza hemoglobinei are loc în elementele tinere nucleate ale seriei roșii din măduva hematogenă: ea începe în stadiul de eritroblast bazofil, crește în eritroblastul policromatofil și oxifil și este încă prezentă în stadiul de reticulocit. În eritrocitul adult sinteza de hemoglobină este absentă. Acidofilia celulei este expresia conținutului ei în hemoglobină.

Cele două componente, hemul și globina, au căi metabolice de sinteză separate, ele cuplându-se în final pentru a forma molecula de hemoglobină. Deși separate, aceste căi nu sunt independente una de alta, ele condiționându-se reciproc.

În cursul dezvoltării, sinteza hemoglobinei începe în a doua lună de gestație, în insulele eritroblastice ce apar în sacul vitelin.

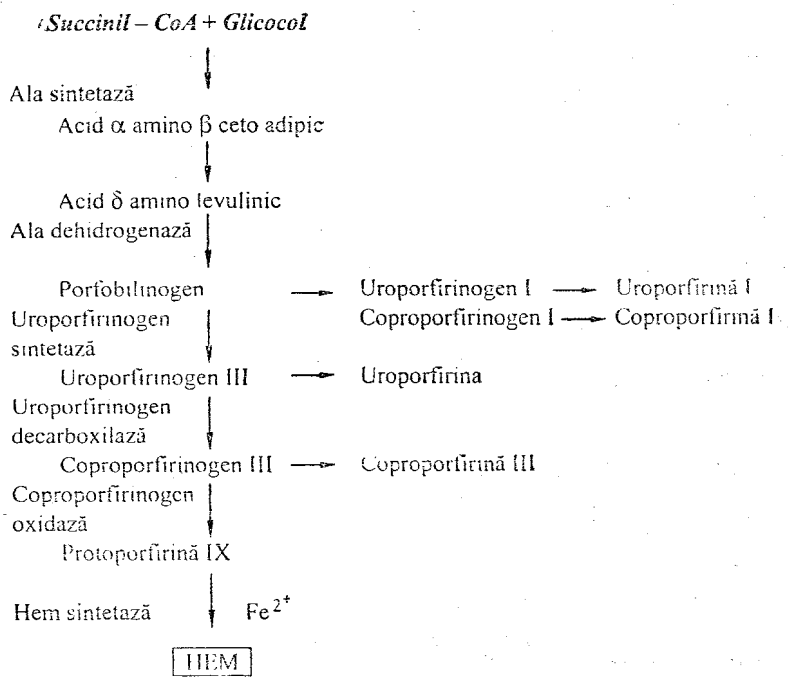


Fig. VI.2. — Biosinteza hemului.

Sinteza hemului (fig. VI.2) pornește de la precursori cu o moleculă mică, respectiv de la glicocol și succinat, care, prin condensare, formează acidul alfa-amino-beta-cetoadipic. Acesta, prin decarboxilare, trece în acid delta-aminolevulinic. Prin condensarea a două molecule de acid delta-aminolevulinic se formează un inel pirolic, porfobilinogenul. Condensarea a patru unități de porfobilinogen formează inelul porfirinic. Mai întâi rezultă o moleculă de uroporfirinogen care, ulterior, trece în coproporfirinogen, iar acesta, prin decarboxilare și oxidare, trece în protoporfirină. Încorporarea fierului în scheletul protoporfirinic are loc în final cu ajutorul hemisintetazei și constituie ultima etapă în sinteza hemului (fig. VI.3). Întregul lanț de reacții este catalizat de 8 enzime specifice de la nivelul mitocondriilor. Cum eritrocitul adult nu mai posedă mitocondrii și pierde o parte din echipamentul său enzimatic, se

explică de ce sinteza hemului încetează în acest stadiu. Sinteza hemului poate produce până la aproximativ 2 000 mg hem zilnic, ceea ce corespunde până la de 6—8 ori rata zilnică de sinteză, aşa cum se observă în anemiile hemolitice regenerative. Mecanismul de control genetic al sintezei hemului este puţin cunoscut.

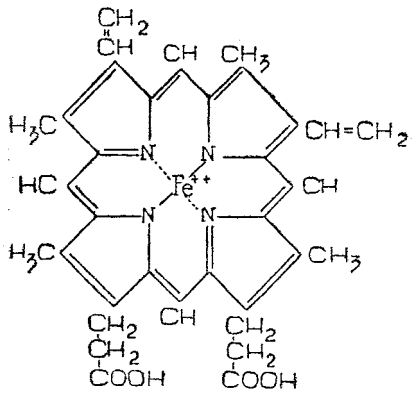


Fig. VI.3. — Structura hemului.

Sinteza globinei, care are loc la nivelul ribosomilor celulari, include două etape: sinteza lanţurilor polipeptidice şi asamblarea acestora în tetramerul de globină.

Lanţurile polipeptidice ce intră în structura globinei din hemoglobinele fiziologice sunt sintetizate sub un control genetic propriu, conform conceptului „o genă=un lanţ polipeptidic", fiecare tip de lanţ (α, β, γ, δ) fiind de fapt o proteină distinctă.

Genele care determină numărul şi secvenţa aminoacizilor din lanţurile polipeptidice ale globinei se numesc gene structurale. Genele lanţurilor de tip α sunt grupate pe braţul scurt al cromosomului 16, iar genele non-α pe braţul scurt al cromosomului 11. Există şi gene şi mecanisme reglatoare insuficient cunoscute care determină timpul şi cantitatea de lanţuri ce se sintetizează într-o anumită perioadă.

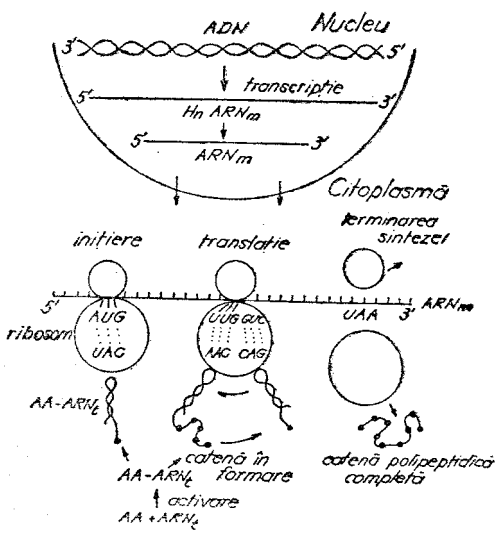


Fig. VI.4. — Reprezentarea schematică a biosintezei de proteine.

Sinteza lanţurilor polipeptidice specifice globinei se desfăşoară după schema generală de sinteză a proteinelor, şi anume (fig. VI.4): mesajul genetic cuprins în secvenţa nucleotidică a ADN cromosomial este transmis prin intermediul ARNm la nivel ribosomal şi redat întocmai în secvenţa aminoacidică a lanţului polipeptidic respectiv.

Treptele intermediare ale mecanismelor biochimice complexe ce intervin în cursul sintezei de proteină pot fi redate schematic astfel: a) sinteza ARNm şi preluarea informaţiei genetice de pe tiparul aflat în ADN, conform principiului perechilor de baze, ARNm având o secvenţă nucleotidică complemenetară ADN copiat — transcripţie; b) migrarea ARNm din nucleu în citoplasmă concomitent cu un adevărat proces de „maturare" structurală; c) activarea aminoacizilor şi formarea complexelor AA—

ARNt, sub acțiunea enzimelor specifice; d) inițierea sintezei care include formarea complexelor de inițiere ca urmare a interacțiunii dintre ARNm, unitățile ribosomale, metionil — ARN_{tf}^{Met}, GTP și alți factori de inițiere (IF-M); e) formarea primului dipeptid; f) adăugarea secvențială de aminoacizi în cursul procesului de translație și elongație; g) terminarea sintezei și eliberarea lanțului polipeptidic nou format.

Pentru toate proteinele, descifrarea mesajului și inițierea sintezei începe la capătul 5′ terminal al ARNm, astfel încât aminoacidul N-terminal este primul aminoacid încorporat în lanțul polipeptidic în formare, iar aminoacidul C-terminal — cel care încheie sinteza.

Aminoacidul N-terminal al lanțurilor α și β din Hb umană este reprezentat de valină. Date relativ recente (1) arată că în procesul de inițiere a sintezei de proteine, inclusiv în sinteza lanțurilor globinice umane, metionina și complexul metionil — ARN_{tf}^{Met} joacă un rol important, codonul AUG (specific pentru metionină) de la acest nivel jucând rol de semnal de inițiere. Se pare că ARN_{tf}^{Met} (f=*first methionine*) este diferit de ARN_t^{Met}, care are rol de a încorpora metionina la alt nivel în structura aminoacidică a lanțului polipeptidic. Ulterior, după încorporarea primilor 15—30 de aminoacizi, metionina este clivată și valina reprezintă aminoacidul N-terminal al lanțurilor α și β globinice.

Se consideră că pe ribosomi există două locuri specifice de legare pentru $AA\text{-}ARN_t$: locul „A" (aminoacil) și locul „P" (peptidil).

În complexul de inițiere, metionil — ARN_{tf}^{Met} este situat pe locul P. Anticodonul său, UAC, este opus codonului de inițiere AUG (împerechere codon-anticodon). Locul A este liber și aliniat în dreptul codonului următor de pe ARNm. Întrucât valina este următorul aminoacid ce trebuie încorporat în sinteză, codonul respectiv trebuie să fie unul din codonii ce codifică valina, spre exemplu GUG.

Valil-ARN_t, care are un anticodon complementar pentru GUG, va ocupa locul A. Are loc apoi formarea enzimatică a unei legături peptidice între grupul carboxil al metioninei și grupul aminic al valinei, cu eliberarea ARN_{tf}^{Met} inițiator (transpeptidare). Dipeptidilul metionil-valil-ARN_t^{Val} va ocupa locul A, iar locul P, în care temporar se va găsi ARN_{tf}^{Met} inițiator, va fi eliberat. În această etapă a sintezei intervin GTP și doi factori de elongație, EF_1 și EF_2.

Complexul Met-Val-ARN_t^{Val} este mutat din locul A în locul P și, simultan, ribosomul avansează cu un codon, astfel că locul A rămas liber va fi aliniat codonului următor de pe ARNm. Acest proces, numit translocație, necesită prezența GTP și a factorului EF_2 (translocaza).

Locul A — liber — va fi ocupat de un nou $AA\text{-}ARN_t$, cu un anticodon corespunzător codonului aflat în dreptul locului A. O nouă legătură peptidică se va forma între gruparea COOH a valinei din dipeptidilul Met-Val-ARN_t și gruparea NH_2 a celui de al 3-lea aminoacid, cu eliberarea ARN_t^{Val}. Tripeptidul va ocupa locul A, iar locul P va rămâne liber prin eliberarea ARN_t^{Val}. Are loc apoi un nou proces de translocație și o nouă avansare a ribosomului pe ARNm cu un nou codon. Astfel, ciclul se repetă prin avansarea ribosomului, codon după codon, de-a lungul ARNm, spre capătul 3′ (C-terminal) al acestuia.

În acest fel, alungirea lanțului polipeptidic în formare progresează, aminoacizii fiind înglobați unul câte unul, în ordinea impusă de tiparul aflat pe ARNm. Sinteza unui lanț complet pentru globină durează în medie 60—80 de secunde.

În condiții fiziologice, pe același lanț de ARNm se desfășoară concomitent sinteza mai multor lanțuri proteice identice (specifice ARNm în cauză), fiecare atașat de propriul său ribosom și într-un stadiu diferit al sintezei. Formarea poliribosomilor trebuie înțeleasă ca un proces dinamic de atașare secvențională a ribosomilor, unul câte unul, pornind de la nivelul regiunii de inițiere și migrând de-a lungul lanțului de ARNm odată cu desfășurarea sintezei de proteină și citire a tiparului înscris pe ARNm.

Fiecare ribosom atașat pe ARNm se găsește într-un moment dat la un anumit nivel pe lanțul de ARNm, purtând fragmentul de proteină în formare, într-un anumit stadiu al sintezei, în raport cu regiunea de pe ARNm până la care s-a efectuat citirea mesajului (1).

Mecanismele intime de terminare a sintezei proteice sunt puțin cunoscute. Se știe că există trei codoni (UAA, UGA și UAG) care sunt codoni „non-sens". Acești codoni specifică terminarea procesului de elongație și sfârșitul sintezei lanțului polipeptidic care urmează a fi eliberat. În momentul în care ribosomul întâlnește codonul non-sens, elongația încetează, lanțul polipeptidic este eliberat și ribosomul se desprinde de pe ARNm și disociază în subunități.

Din reticulocite a fost izolat un factor de „terminație" denumit factorul R *(release)*, care se pare că ar avea rol atât în recunoașterea codonilor stop și terminarea sintezei, cât și în eliberarea de pe ribosomi a lanțului polipeptidic complet, nou sintetizat (1).

Formarea tetramerilor de hemoglobină. Sinteza lanțurilor globinice la nivelul ribosomilor este numai una din etapele necesare formării tetramerului funcțional de hemoglobină.

Lanțurile globinice libere, nou sintetizate, sunt rapid încorporate în molecule complete de Hb. Procesul este spontan și practic instantaneu, în afara hemului nefiind necesari alți factori. Este admis că, în procesul de asamblare a tetramerului de Hb, formarea dimerilor $\alpha\ \beta$ este o etapă fiziologică. Alte etape intermediare ale asamblării tetramerului sunt încă neelucidate. Nu se știe dacă hemul se atașează de globină în forma sa bivalentă-fiziologică sau în formă trivalentă, formând MetHb, care apoi este redusă enzimatic în Hb funcțională.

Se admite că hemul nu se fixează pe lanțurile globinice înainte de eliberarea lor de pe ribosomi și se pare că are o afinitate mai mare pentru lanțurile α în raport cu lanțurile β.

Este foarte probabil ca fixarea hemului pe fiecare lanț globinic și asamblarea lanțurilor în tetramer să fie procese independente, astfel încât tetramerii să se poată forma înainte ca toate lanțurile globinice să fi fixat gruparea hem. S-au pus în evidență molecule de Hb nou formate care conțin numai două grupări hem, ambele legate de lanțurile α.

Hemul este un stimulator important al sintezei de globină. În stările cu deficit de hem (lipsa de Fe, anemii sideroblastice, intoxicația cu Pb), se pare că are loc acumularea unei proteine care acționează ca inhibitor specific atât al procesului de inițiere a sintezei de globină, cât și a

altor proteine. Inhibitorul acționează ca o protein-kinază, favorizând fosforilarea factorului de inițiere IF-2. Hemul ar activa o enzimă care favorizează defosforilarea și menținerea inhibitorului în forma inactivă. Deficiența de hem reduce sinteza tuturor lanțurilor globinice, dar date experimentale arată că sinteza de lanțuri α este mai afectată în raport cu sinteza lanțurilor β.

Molecula fiziologică de Hb are o stabilitate de câteva ori mai mare decât lanțurile globinice libere sau decât dimerii formați de acestea, asamblarea în tetramer asigurând, astfel, pe lângă creșterea eficienței funcției de transport a O_2 și o stabilitate mai mare a moleculei. Informația care coordonează procesul de asamblare în tetramer este conținută, probabil, în însăși structura primară a lanțurilor polipeptidice ale globinei.

Sinteza lanțurilor α, non- α și a hemului trebuie să fie strict corelată, astfel ca aceste componente să fie produse în final în proporții relativ echivalente pentru a se uni în molecula completă de Hb.

Date experimentale, bazate pe măsurarea directă a numărului de poliribosomi α și β, arată că numărul de poliribosomi α este cu aproximativ 50% mai mare decât cel pentru sinteza lanțurilor β, în condițiile unei producții relativ egale de lanțuri α și β. În acest fel, ARNm pentru β-globină, deși mai redus cantitativ, pare să fie mai eficient în sinteză, în raport cu ARNm pentru α-globină. Aceste date pledează în favoarea ideii conform căreia coordonarea sintezei lanțurilor α și β se realizează printr-un mecanism complex, încă neelucidat.

Reglarea sintezei lanțurilor α este probabil realizată printr-un mecanism de *feed-back*, de către însuși *pool*-ul de lanțuri libere α; sinteza de lanțuri β are un efect puțin important asupra sintezei de lanțuri α. Reglarea sintezei lanțurilor β se face indirect, sinteza acestor lanțuri depinzând de cantitatea de lanțuri α libere aflate în citoplasmă. Se pare că acest mecanism complex de reglare acționează la nivelul procesului de inițiere a sintezei.

Hemoglobinele fiziologice. În cursul dezvoltării organismului de la embrion la adult se succedă mai multe tipuri de hemoglobină. Hemoglobinele embrionare Gower 1 ($\zeta_2\ \varepsilon_2$), Portland ($\zeta_2\ \gamma_2$) și Gower 2 ($\alpha_2\ \varepsilon_2$) sunt înlocuite, începând de la sfârșitul lunii a treia de gestație, de către Hb fetală (HbF), care reprezintă principala Hb din cursul dezvoltării fetale. La naștere, HbF reprezintă 70—80% din totalul Hb, după care sinteza sa scade rapid ajungând la sfârșitul primului an de viață la valori sub 2%. HbA_1 și HbA_2 sunt caracteristice perioadei adulte de dezvoltare. Sinteza lor începe încă în perioada de dezvoltare fetală, iar după naștere ele înlocuiesc rapid HbF. La adultul normal, HbA_1 reprezintă 97—98%, HbA_2 2—3%, iar HbF sub 1%.

Hemoglobina A_1 ($\alpha_2\ \beta_2$) reprezintă componenta majoră a Hb din eritrocitele adultului normal. În structura globinei din HbA_1 intră două lanțuri α și două β, ce diferă între ele prin structura lor primară. Ea este caracterizată în mod obișnuit, prin mobilitatea sa electroforetică, punctul izoelectric (pH 6,87), prin afinitatea pentru O_2 și prin viteza de denaturare în mediul acid sau alcalin. Cele mai multe proprietăți fizice și chimice stabilite pentru hemoglobină se referă la HbA_1 (fig. VI.5).

Hemoglobina F ($\alpha_2 \gamma_2$) constituie componenta majoră a Hb în perioada dezvoltării fetale. În sângele de cordon ombilical și la nou-născut ea reprezintă 70—80% din totalul hemoglobinei. În structura globinei din HbF intră două lanțuri α și două lanțuri γ. Rezistența crescută la denaturarea alcalină reprezintă caracteristica cea mai importantă a HbF. Pe această proprietate se bazează și determinarea ei cantitativă pe cale chimică. Rezistența crescută la denaturarea alcalină a HbF ar putea fi datorată, pe de o parte, structurii primare proprii lanțurilor γ, iar pe de altă parte, legăturilor chimice ce se stabilesc între lanțurile α și γ. Aceste legături sunt diferite de legăturile corespunzătoare dintre lanțurile α și β din HbA_1.

Hemoglobinele fiziologice	*Hb Gower 1*	$= \zeta_2 \varepsilon_2$	*embrion*
	Hb Portland	$= \zeta_2 \gamma_2$	
	Hb Gower 2	$= \alpha_2 \varepsilon_2$	
	Hb F	$= \alpha_2 \gamma_2$	*făt*
	Hb A	$= \alpha_2 \beta_2$	*adult*
	Hb A_2	$= \alpha_2 \delta_2$	

Fig. VI.5. — Hemoglobinele fiziologice.

O altă caracteristică a HbF este afinitatea crescută pentru O_2 în raport cu Hb_1A, fapt care se explică prin aceea că HbF leagă 2, 3-DPG mai greu decât HbA_1. Această caracteristică a HbF stă la baza trecerii O_2 de pe HbA_1 din eritrocitele materne pe HbF din eritrocitele fetale, la nivelul capilarelor vilozităților coriale ale placentei.

În prezent este unanim admis că în structura HbF există două tipuri de lanțuri γ: unele care conțin în poziția 136 glicină (Gγ) și altele care au în acea poziție alanină (Aγ), HbF fiind de fapt un amestec din cele două tipuri de Hb. În timpul dezvoltării fetale, predomină sinteza lanțurilor de tip Gγ (raportul Gγ/Aγ=3/1), pentru ca, după naștere, raportul dintre cele două tipuri de lanțuri γ să se inverseze (Gγ/Aγ=2/3).

Valori crescute de HbF față de normal se găsesc în diverse situații fiziologice sau patologice: sarcină, anemii severe diverse, anemie Biermer, leucemii, persistența ereditară a HbF, β-talasemia hetero- și homozigotă, alte hemoglobinopatii.

Hemoglobina A_2 ($\alpha_2 \delta_2$) reprezintă 2—3% din totalul Hb. În hemoglobina HbA_2 intră două lanțuri α și două lanțuri δ. Sinteza lanțurilor începe încă din timpul vieții fetale odată cu cea a HbA_1 și se menține apoi constant tot restul vieții. Conținutul în aminoacizi al lanțurilor δ este apropiat de cel al lanțurilor β din HbA_1, diferența dintre aceste două tipuri de lanțuri fiind numai de 10 aminoacizi. HbA_2 poate fi ușor separată electroforetic de HbA_1, întrucât ea are o mobilitate electroforetică evident mai lentă decât a HbA_1.

Gena δ ar putea proveni dintr-o duplicare a genei β, lângă care se află așezată pe cromosomul 11. Procentul foarte redus, de 2—3%, din totalul hemoglobinei A_2 la adultul normal ar putea fi explicat printr-o mutație intervenită la nivelul regiunii de inițiere a sintezei sau foarte aproape de aceasta, mutație care explică ritmul lent de sinteză al genei structurale δ și cantitatea mică de lanțuri δ ce intră în structura HbA_2. Diferența de 10 aminoacizi dintre lanțurile δ și β se explică,

de asemenea, prin mutații punctiforme intervenite de-a lungul genei structurale β, în cursul evoluției.

În afara Hb fiziologice amintite, caracterizate prin structuri proprii, determinate genetic, au mai fost descrise unele componente minore, nedeterminate genetic, care reprezintă de fapt modificări ale Hb normale, apărute *in vivo* sau *in vitro*, cum sunt: HbA_{1c} — produs rezultat din legarea glucozei de HbA; HbA_3 — artefact rezultat din legarea glutationului la Hb în cursul conservării; și HbF_1 — forma acetilată a HbF.

Funcția hemoglobinei. Rolul important pe care-l deține hemoglobina ca pigment respirator se datorește proprietății sale de a fixa reversibil oxigenul și de a-l ceda cu ușurință țesuturilor. Ea fixează cu aviditate oxigenul la nivelul capilarelor pulmonare, îl vehiculează cu globulele roșii în circulație și îl eliberează țesuturilor unde presiunea oxigenului în capilarele tisulare este joasă.

Evoluția pigmentului respirator primitiv monocatenar până la tetramerul de Hb, prin împerecherea de lanțuri diferite, cu posibilitatea de interacțiune între subunități, ca și înglobarea acestui pigment în eritrocit, a crescut capacitatea sângelui de a se combina cu oxigenul — de la 0,5 ml O_2/dl sânge la circa 25 ml O_2/dl sânge — și a determinat o modificare a curbei de disociere a oxigenului de la aspectul ei hiperbolic la cel sigmoid, mult mai eficace funcțional (fig. VI.6).

Această structură permite eritrocitului să transporte, în mod rapid, oxigen oricărui țesut îndepărtat de suprafața respiratorie.

Eliberarea de oxigen către organe și țesuturi este direct proporțională cu fluxul sanguin, concentrația de Hb și diferența în saturația cu oxigen dintre sângele arterial și cel venos.

O deplasare la stânga a curbei de disociere a Hb scade eliberarea de oxigen către țesuturi. Ea se poate produce în mai multe situații: creșterea rapidă a unei acidoze metabolice, transfuzii multiple de sânge conservat în lichid prezervant, sărăcit în 2, 3-DPG, prezența de HbF sau a unei Hb, alterată chimic (methemoglobină, carboxihemoglobină, hemoglobine anormale).

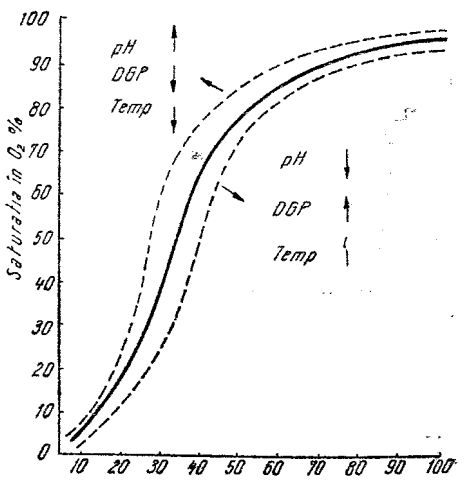


Fig. VI.6. — Curba de disociere a Hb.

Fixarea oxigenului se face de către Fe din hem și în acest proces de oxigenare și reducere a Hb, fierul rămâne bivalent.

Legarea O_2 de fier se face la nivelul legăturii care asigură contactul dintre fier și histidina din poziția 63 a lanțului β (respectiv 58 pentru lanțul α). În Hb redusă, legarea fierului de nucleul imidazolic al histidinei se face printr-o legătură de hidrogen, prin intermediul unei molecule de apă. În oxihemoglobină, molecula de apă este îndepărtată și O_2 se fixează direct de fier la acest nivel. Fiecare atom de fier fixează o

moleculă de O_2. Reacţia reversibilă $Hb+O_2 \rightleftharpoons HbO_2$ este orientată într-un sens sau altul de presiunea parţială a O_2 de la nivelul alveolelor pulmonare şi respectiv de la nivelul ţesuturilor. Cele 4 grupări hem din molecula de Hb fixează oxigenul cu viteze diferite, datorită fenomenului de cooperativitate dintre moleculele hem. Fixarea oxigenului pe una din cele patru grupări hem determină modificări în conformaţia moleculei, uşurând reacţia celui de-al doilea hem neoxigenat care, la rândul lui, va influenţa pe cel de-al treilea. Aşa se explică de ce fixarea oxigenului pe hemurile 3 şi 4 se face incomparabil mai rapid decât pe primul hem. Interacţiunea hem-hem se datoreşte unei rearanjări a subunităţilor în cadrul moleculei în timpul fixării sau eliberării oxigenului. Această schimbare reversibilă în structura spaţială, în raport cu fixarea şi eliberarea oxigenului, realizează o adevărată „mişcare respiratorie" a moleculei de Hb, în care legăturile intercatenare de la nivelul subunităţilor $\alpha_1 \beta_2$ şi $\alpha_2 \beta_1$ au un rol esenţial (6). În afară de fenomenul de cooperativitate dintre subunităţile moleculei, capacitatea Hb de a fixa şi ceda cu uşurinţă oxigenul este influenţată şi de diverşi constituenţi intracelulari, dintre care un rol important îl are *2, 3-difosfogliceratul,* un produs intermediar al glicolizei care este specific legat de deoxihemoglobină la nivelul cavităţii centrale a moleculei.

Deşi locul de legare al 2,3-DPG pe Hb este diferit de cel al oxigenului, între 2,3-DPG şi oxigen există o relaţie reciprocă de excludere: în prezenţa unor cantităţi crescute de 2,3-DPG are loc o descreştere a afinităţii sângelui pentru oxigen pe două căi: fixare directă pe deoxihemoglobină şi indirect scăzând pH-ul hematiei faţă de pH-ul plasmei şi, invers, descreşterea 2,3-DPG determină creşterea afinităţii pentru oxigen. Această interrelaţie reciprocă este un exemplu de efect alosteric la nivelul hemoglobinei.

Alcaloza produce o creştere a 2,3-DPG, iar acidoza o scădere a acestuia. Efectul direct al pH asupra afinităţii hematiei pentru oxigen (efectul Bohr) este opus efectului indirect al pH asupra concentraţiei de 2,3-DPG.

Bioxidul de carbon rezultat în urma proceselor de oxidare participă, de asemenea, în procesul de eliberare a oxigenului. Această interdependenţă dintre pH-ul acid şi eliberarea oxigenului de către Hb, cunoscută sub numele de *efect Bohr,* este absentă la pigmenţii respiratori monocatenari (mioglobina).

În afara rolului fundamental jucat în procesul de respiraţie, Hb deţine un rol important în menţinerea echilibrului acidobazic. Sistemul tampon realizat de HbO_2/Hb contribuie în mod deosebit la menţinerea pH-ului sanguin în anumite limite.

Derivaţi hemoglobinici. Hemoglobina poate fixa şi alţi compuşi, formând diverşi derivaţi hemoglobinici:

— *Carboxihemoglobina* (HbCO) este compusul rezultat din legarea la Hb a CO. HbCO este un compus reversibil, CO legându-se direct de fier la nivelul locului de legare a O_2, dar afinitatea Hb pentru CO este de 218 ori mai mare decât cea pentru O_2. Aşa se explică rapiditatea apariţiei şi gravitatea intoxicaţiei cu CO, chiar în situaţiile când concentraţia CO în aerul inspirat este relativ mică (0,05—0,1%). În intoxicaţii uşoare (20% HbCO în sânge), semnele intoxicaţiei constau în

cefalee, iritabilitate, stare confuzională. La concentrații de peste 50% HbCO în sânge, intoxicația este severă, bolnavul prezentând vomă, convulsii, tulburări respiratorii, comă și moarte. Cel mai caracteristic semn al intoxicației cu CO este culoarea roșie purpurie a tegumentelor și mucoaselor date de HbCO. Oxigenoterapia sub presiune dislocă CO și duce la salvarea bolnavului, dar adesea în intoxicațiile severe rămân sechele la nivelul sistemului nervos central sau la nivelul cordului.

— *Carbohemoglobina* este compusul format prin legarea la Hb a CO_2. Legarea CO_2 nu se face la nivelul atomului de fier, ci la grupările aminice libere ale globinei, formând un compus carboaminic — globina —NH—COO^- — formă sub care o parte din CO_2 este transportat de la nivel tisular la alveolele pulmonare. Atât în carboxihemoglobină, cât și în carbohemoglobină fierul este bivalent.

— *Heminele* sunt compuși cu structură asemănătoare hemului, de care diferă însă prin faptul că fierul este trivalent (Fe^{3+}). În clorhemină, cea de-a treia valență a fierului este legată de ionul Cl^-, iar în hematină de ionul OH^-.

— *Methemoglobina* (MetHb) este o ferihemoglobină în care gruparea prostetică este reprezentată de hematină. În MetHb, fierul, fiind trivalent, nu poate lega reversibil O_2, ceea ce face ca MetHb să nu îndeplinească funcția respiratorie de transportor de O_2. Valori mici de MetHb (sub 2%) se găsesc și la normal, ca rezultat al oxidării Hb. Sângele care conține MetHb în concentrație ridicată are o culoare brun-ciocolatie. MetHb formată în mod fiziologic este redusă în Hb de către sistemele reducătoare ale eritrocitului, în care NADH-MetHb reductaza sau diaforaza I deține rolul principal.

— *Sulfhemoglobina* (SulfHb) nu este încă bine caracterizată din punct de vedere chimic. Ea este un derivat hemoglobinic impropriu pentru transportul O_2. Spre deosebire de MetHb, SulfHb nu poate fi convertită în Hb. Există droguri care pot include SulfHb, din care cele mai comune sunt acetanilida și fenacetina. Odată formată SulfHb nu poate fi îndepărtată din organism decât prin flebotomie. S-a descris SulfHb cu cianoză (cianoză enterogenă) în unele tulburări digestive însoțite de constipație și producere în exces de hidrogen sulfurat. S-a descris, de asemenea, un caz de SulfHb ereditară. Sângele care conține SulfHb are o culoare brună-mov.

Diverșii derivați ai Hb au spectre de absorbție caracteristice și examenul spectroscopic al sângelui îi poate diferenția (tabelul 6.I).

Catabolismul hemoglobinei. Distrugerea eritrocitelor este un proces fiziologic ce are loc la sfârșitul celor 120 ± 20 de zile cât este durata de viață normală a acestor celule.

Se apreciază că, în mod fiziologic, zilnic se produce și se distruge 1% din cantitatea totală de eritrocite și de Hb circulantă. Cum un adult normal are în sângele circulant aproximativ 750 g Hb și cum un gram de Hb dă naștere la 36,2 mg bilirubină, zilnic se distrug aproximativ 7—8 g Hb, din care rezultă în medie 260 mg bilirubină.

Molecula de Hb eliberată de eritrocitul distrus la nivelul SRE este clivată în elementele componente: globina și hemul. Globina este reutilizată ca sursă de aminoacizi în procesele metabolice ale organismului. Catabolismul inelului protoporfirinic al hemului are loc în mai multe

etape, dintr-un mol de hem rezultând un mol de fier, CO și bilirubină. Fierul este eliberat și reintrodus într-un nou circuit, fie ca fier de depozit (feritină sau hemosiderină), fie în eritropoieză, fie la formarea altor compuși ce conțin Fe.

Inelul de protoporfirină este desfăcut la nivelul punților de α-meten de către hemoxigenaza microsomală. În reacție intervine citocromul P-450 cu rol de oxidază terminală, NADPH cu rol de cofactor și O_2.

TABELUL 6.I

Spectrele de absorbție ale derivaților hemoglobinei

Derivatul hemoglobinic	Nr. benzilor	Maximele de absorbție în nm.			
Hb	1		565		
Hb O_2	2		577	545	
Hb Co	2		570	535	
Met Hb	4	630	578	540	500
Sulf Hb	3	618	578	540	
CNMetHb	2			540	414

Din desfacerea protoporfirinei rezultă oxid de carbon (CO) și biliverdină, care este o moleculă în lanț, formată din patru piroli, ce constituie structura de bază a pigmenților biliari: CO este transportat sub formă de HbCO și eliminat la nivelul plămânilor. Cantitatea de CO endogen format reflectă rata de catabolism a hemului, care este crescută la pacienții cu hemoliză sau eritropoieză ineficientă (7).

Biliverdina este redusă în bilirubină printr-o nouă reacție enzimatică în care intervine biliverdin reductaza și NADPH (fig. VI.7).

Cea mai mare parte din biliverdina formată în organism rezultă, astfel, din degradarea Hb conținută în eritrocitele îmbătrânite și distruse. Există dovezi că aproximativ 15—20% din bilirubină provine și din alte surse: eritrocite sau precursori distruși prematur intramedular, hem sau porfirine neutilizate în cursul procesului de sinteză a Hb, alți compuși nehemoglobinici care conțin hem. La subiecții normali, nivelul plasmatic al bilirubinei totale este de 0,5—1 mg/dl.

Bilirubina liberă rezultată din reducerea biliverdinei este legată de o albumină plasmatică, în proporție de o moleculă albumină pentru două molecule bilirubină, devenind, astfel, dintr-o substanță liposolubilă (cu proprietatea de a traversa membranele celulare) o substanță parțial solubilă în apă, numită bilirubina indirectă (prehepatică).

Metabolismul bilirubinei presupune mai multe etape, și anume: transportul către celula hepatică, conjugarea intrahepatică, excreția, ci-

clul enterohepatic. Majoritatea acestor etape includ procese enzimatice complexe, din care unele nu sunt încă elucidate în totalitate.

Bilirubina indirectă, după desfacerea de albumină plasmatică, pătrunde în celula hepatică printr-un mecanism complex, în care intervin două proteine — Y și Z — aflate în citoplasma hepatocitului și care au rol de „purtător" pentru anionii organici.

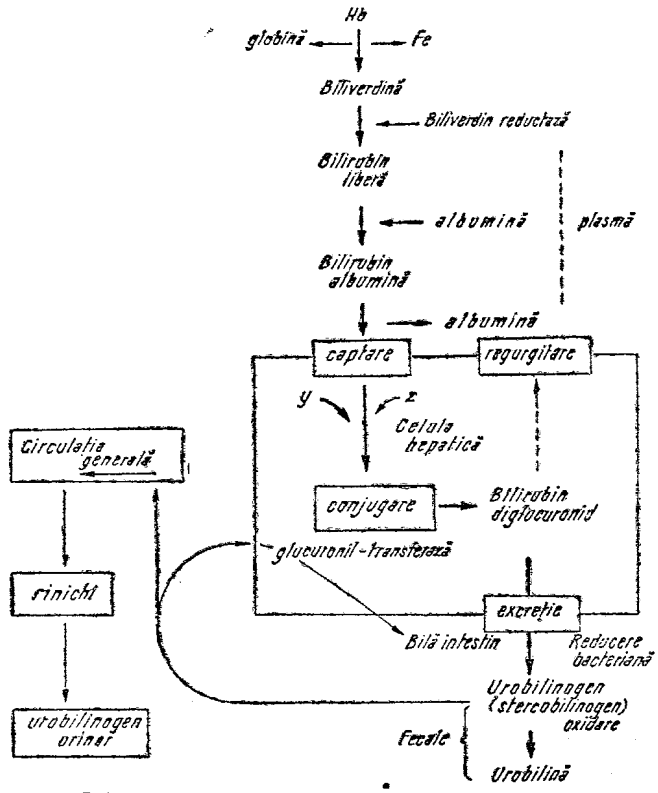


Fig. VI.7. — Catabolismul Hb și formarea pigmenților biliari.

Proteina Y sau *ligandina* joacă rolul principal în pătrunderea bilirubinei în hepatocit. Ligandina este mai scăzută în celulele hepatice ale nou-născutului și acțiunea sa este potențată de fenobarbital, administrarea acestuia ducând la scăderea nivelului de bilirubină din plasmă.

Dereglarea mecanismului de pătrundere a bilirubinei în celula hepatică constituie tulburarea de bază din așa-numitul „icter cu prag" din sindromul Gilbert. La nivelul ficatului, bilirubina este conjugată cu acidul glucuronic (provenit din acid diglucuronid difosfat uridină printr-un proces enzimatic în care intervine glucuronil transferaza), rezultând bilirubina conjugată sau hepatică.

Reacția de conjugare a bilirubinei dă naștere la doi produși hidrosolubili, monoglucuronid și diglucuronid bilirubina, aceasta din urmă fiind produsul fiziologic principal (7).

Posibilitatea conjugării bilirubinei și cu alți compuși — cum ar fi sulfatul — ca o cale secundară de conjugare, este astăzi controversată.

Noțiunile de bilirubină indirectă și bilirubină directă se referă la comportarea diferită a celor două tipuri de bilirubină față de reactivul Ehrlich în reacția Van den Bergh; bilirubina neconjugată nu reacționează cu reactivul diazo-Ehrlich decât după adăugarea de alcool (reacție indirectă), în timp ce bilirubina conjugată se cuplează imediat cu reactivul Ehrlich și dă o culoare roșie (reacție directă).

Deficitul enzimatic de glucuronil transferază duce la scăderea funcției de conjugare hepatică, care se află la baza sindromului Crigler-Najjar.

În etapa următoare, bilirubina conjugată este excretată în canaliculele biliare, de unde ajunge apoi în intestin împreună cu bila. Funcția de excreție biliară este un proces activ, energodependentă, etapa precedentă de glucuronoconjugare fiind indispensabilă pentru excreție.

La nivelul căilor biliare, o mică parte din bilirubina conjugată poate fi reabsorbită ca bilirubină liberă, dar cea mai mare parte este transformată printr-un proces de reducere, sub acțiunea bacteriilor intestinale, într-un grup de substanțe necolorate, cunoscute sub denumirea de urobilinogen.

Urobilinogenii au aceeași structură chimică de bază, adică un lanț tetrapirolic și diferă între ei prin numărul de atomi de hidrogen (tabelul 6.II).

O parte din urobilinogen este reabsorbită din intestin în circulația portală, de unde ajunge în ficat, fiind reexcretat în bilă ca bilirubină. Acest ciclu constituie circuitul enterohepatic al urobilinogenului. Cantități mici din urobilinogenul ajuns în ficat prin circuitul enterohepatic trec în sânge și sunt excretate prin rinichi ca urobilinogen urinar.

TABELUL 6.II

Compușii urobilinogen-urobilină

Compusul	Reacția	Produsul reacției
Urobilinogen	$C_{33}H_{42}N_4O_6 \xrightarrow{-2H}$	Urobilină
Mezobilirubinogen	$H_{44} \xrightarrow{-2H}$	Urobilină
Stercobilinogen	$H_{48} \xrightarrow{-2H}$	Urobilină-stercobilină

În final, 99% din urobilinogen este eliminat ca atare prin fecale (stercobilinogen), iar urobilinogenul urinar nu constituie decât 1% din totalul bilirubinei formate în organism.

Urobilinogenul fecal este transformat parțial — sub acțiune bacteriană sau prin expunere la aer — în urobilină, substanță de culoare portocalie.

Insuficiența celulei hepatice de a excreta bilirubina conjugată în canaliculele biliare, probabil printr-un defect de membrană, constituie tulburarea fundamentală din sindromul de colestază Dubin-Johnson.

Pentdiopentul este un alt produs de degradare a bilirubinei care poate apărea în anumite condiții patologice (diverse forme de icter, ficatul de stază etc.). Acesta este un compus cu două inele pirolice și poate fi pus în evidență în sânge și urină prin reacția Wimplinger [cu $Ca(OH)_2$ și hiposulfit de sodiu la fierbere], cu care dă culoarea roșie.

BIBLIOGRAFIE

1. BENZ J. E., FORGET G. B. Jr.: Semin. Hematol. 1974, 11: 463.
2. BERCEANU ȘT.: Hematologie clinică, Edit. Medicală, București, 1977.
3. GIBLET R. E.: În Genetic Merkers in Human Blood. Blackwell Sci. Publ., Oxford, Edinburgh, 1969, 347.
4. LEHMAN H., HUNTSMANN R. C.: Man's hemoglobins. North Holland Publ., Amsterdam, 1968.
5. LEHMAN H., KYNOCH M. A. P.: Human haemoglobin variants and their characteristics, North Holland Publ., Amsterdam, 1976.
6. PERUTZ F. M.: Brit. Med. Bull. 1976; 32: 3.
7. WEATHERALL J. D., CLEGG J. B.: The Thalassaemia Syndromes, Blackwell Sci. Publ., Oxford — Londra, 1982.
8. WILLIAMS J. W., BEUTLER E., ERSLEV A. I., RUNDLES W. J.: Hematology. Edit Mc. Graw Hill, New York, 1977.

VII

SERIILE GRANULOCITARE

G. GRIGORIU

Prin serii granulocitare se înțelege totalitatea precursorilor și a celulelor adulte granulocitare neutrofile, eozinofile și bazofile ce pot fi recunoscute morfologic în măduva osoasă, sânge și țesuturi (planșa a II-a). Cu toate că cele trei tipuri de celule granulocitare sunt înrudite, ele se disting prin filiația și funcționalitatea lor. Toate au o origine comună în celula stem pluripotentă. Aceasta ca și celelalte celule progenitoare nu pot fi recunoscute morfologic. După trecerea prin stadiul de celulă formatoare de colonii granulo-, eritro-, monocito-, megacariocitare, pentru fiecare tip de granulocit se constituie o celulă progenitoare proprie: pentru neutrofil CFC-GM și CFC-G, pentru eozinofil CFC-Eo și pentru bazofil CFC-Ba (vezi capitolul I). Acestea sunt ultimele celule sanguine neidentificabile morfologic. Prin diferențierea și maturarea acestora se inițiază cele trei serii de granulocite, accesibile examenului microscopic.

SERIA GRANULOCITARĂ NEUTROFILĂ

MORFOLOGIA GRANULOCITELOR NEUTROFILE

Mieloblastul este celula granulocitară „cap de serie". El are forma rotundă, diametrul de 10—18 μm și un nucleu care ocupă aproape toată celula. Citoplasma este puțină, situată uneori numai într-o parte a nucleului, colorată în albastru (bazofilă), de aspect hialin sau spongios. Unii admit că mieloblastul poate avea câteva granulații azurofile mari în citoplasmă, dar corect este ca celula cu aspect de mieloblast și cu granulații azurofile să fie considerată promielocit. Nucleul este rotund sau oval, cu cromatina fin dispersată, realizând un aspect punctat, dan-

telat sau de sită. Prin această structură nucleară fină mieloblastul se deosebește de proeritroblast și de limfoblast. Membrana nucleară este foarte fină, slab definită. Nucleonii, în număr de 2—5, de culoare albastru deschis, cu condensare slabă în jurul lor, contribuie la diferențierea mieloblastului de limfoblast (fig. VII.1).

Microscopia electronică confirmă structura de celulă slab diferențiată, adăugând detalii, ca prezența de numeroși ribosomi liberi, cantitate

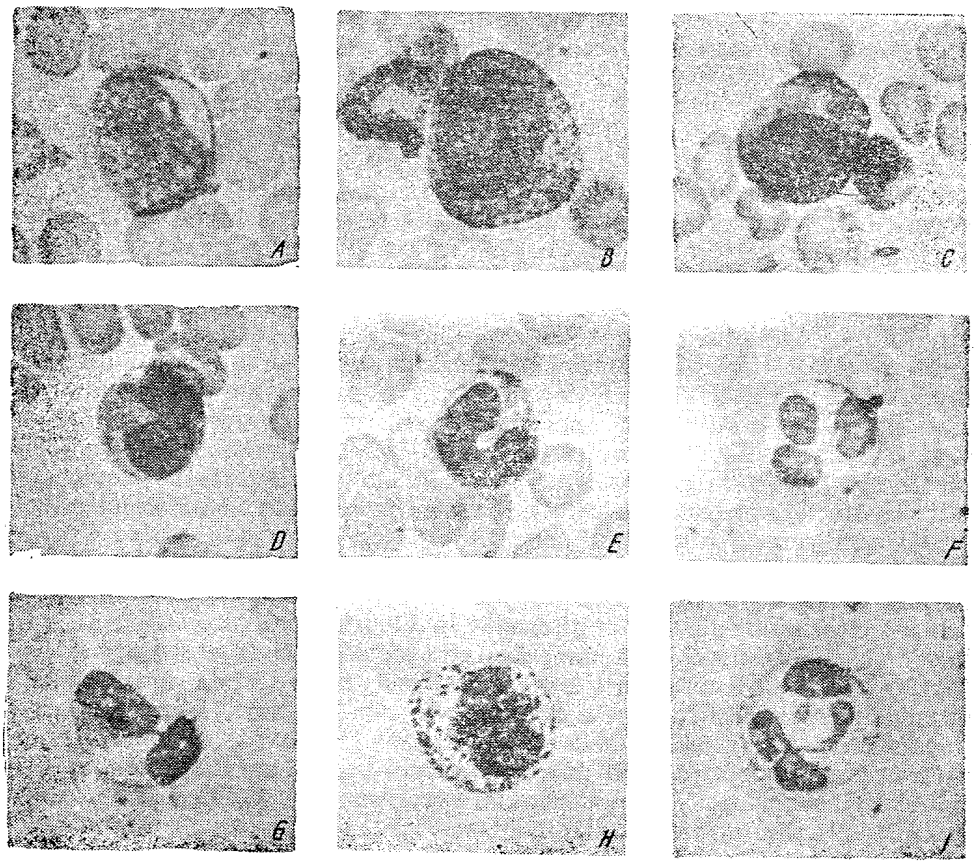


Fig. VII.1. — Celulele seriilor granulocitare. A. Mieloblast. B. Promielocit. C. Mielocit neutrofil. D. Metamielocit neutrofil. E. Neutrofil nesegmentat. F. Neutrofil segmentat. G. Eozinofil segmentat. H. Bazofil segmentat. I. Apendice nuclear sexual într-un neutrofil segmentat.

redusă de reticul endoplasmic și aparat Golgi puțin dezvoltat. Mitocondriile sunt numeroase și mici (39).

Promielocitul este precursorul granulocitar cu un diametru de 12—25 µm, ceva mai mare decât mieloblastul. Nucleul este rotund, oval sau sub formă de boabă de fasole, cu cromatina fin structurată, puțin mai densă decât la mieloblast. Nucleolii sunt în număr de 1—3, tot mai puțin evidenți odată cu maturarea celulei. Citoplasma este abundentă,

albastră, cu o zonă mai clară perinucleară, cu granulații azurofile, roșii-violete.

Microscopia electronică pune în evidență un aparat Golgi bine dezvoltat, cu 4—9 cisterne dispuse semicircular în jurul centriolului. Granulațiile azurofile, denumite și granulații primare, se formează prin agregarea mai multor vacuole ce iau naștere din cisterne pe fața concavă a aparatului Golgi. Aceste granulații sunt dense, rotunde, cu un diametru maxim de 0,8 μm. Alături de ele, promielocitul poate conține granulații specifice care încep să se producă în zona centrală a celulei.

Granulațiile azurofile sau „primare" sunt lisosomi, cu membrană proprie, care conțin enzime și alte substanțe necesare procesului de fagocitoză. Cea mai importantă și caracteristică este peroxidaza. În plus, se mai găsesc hidrolaze acide, proteaze și proteine cationice bactericide. Culoarea roșie vie a granulațiilor azurofile se explică prin prezența mucozaharidelor sulfate. Granulațiile „toxice" care apar în neutrofile în cursul infecțiilor sau inflamațiilor sunt granulații primare persistente.

Mielocitul are dimensiuni de 12—18 μm și posedă un nucleu excentric, de formă rotundă sau ovală. Cromatina nucleară este mai condensată, iar nucleolii mici sau invizibili. Citoplasma este slab bazofilă. Granulațiile azurofile sunt prezente în mielocit, dar nu se mai formează altele noi. De altfel, ele persistă până la stadiul de granulocit matur, dar diminuează cantitativ cu fiecare mitoză. Caracteristic pentru mielocit este prezența granulațiilor „secundare", neutrofile, care apar în acest stadiu. Microscopia electronică a demonstrat că granulațiile secundare se formează pe fața convexă a aparatului Golgi (3). Reticulul endoplasmic și poliribosomii sunt în cantitate redusă, explicând scăderea bazofiliei. Mitocondriile sunt mici și puține.

Granulațiile neutrofile sunt caracterizate prin prezența fosfatazei alcaline. Aceasta poate fi pusă în evidență și dozată semicantitativ prin tehnici citochimice, având importanță în diagnosticul diferențial al bolilor mieloproliferative. Cele mai scăzute valori, până la absență, ale fosfatazei alcaline leucocitare se înregistrează în leucemia granulocitară cronică. Valori mari se găsesc în policitemia vera și valori foarte mari în neutrofiliile din infecții. În granulațiile neutrofile sunt, de asemenea, prezente aminopeptidaze, lizozim, lactoferină, proteina fixatoare a vitaminei B_{12}, citocrom, NADPH oxidaza, fagocitină și proteine bazice. Aproximativ 2/3 din cantitatea de lizozim a neutrofilelor se găsește în granulațiile neutrofile; restul de 1/3 este conținută în granulațiile azurofile.

Producția de granulații, elementele esențiale oricărui tip de granulocit, este terminată în stadiul de mielocit. Evoluția ulterioară a precursorilor granulocitari se face prin micșorarea diametrului celular, modificarea formei și structurii nucleului.

Metamielocitul are diametrul de 10—18 μm, nucleul încurbat cu cromatina mai densă, cu aglomerări de-a lungul membranei nucleare și fără nucleoli. Citoplasma este roz pal, cu granulații specifice. Reticulul endoplasmic și poliribosomii sunt mai puțini, dovadă că sinteza de proteine este încheiată.

Neutrofilul nesegmentat: caracteristice pentru acest stadiu de evoluție sunt condensarea cromatinei nucleare și forma de bandă a nucleului, realizând aspecte de potcoavă sau literă S. Uneori nucleul prezintă una

sau mai multe constricții de dimensiuni variabile. Dacă legătura dintre două zone nucleare depășește 1/3 din grosimea benzii nucleare, celula trebuie clasificată ca neutrofil nesegmentat.

Neutrofilul segmentat este elementul final, matur al seriei. Acesta are dimensiuni de 10—15 μm, cu un nucleu lobat și cromatina densă, uniformă. Numărul de lobi nu trece, în mod normal, de cinci. Dacă 5% din neutrofilele segmentate au 5 lobi nucleari sau un singur neutrofil are 6 sau mai mulți lobi, se consideră *hipersegmentare,* fenomen caracteristic pentru deficiențele de vitamină B_{12} sau acid folic. În 3% din neutrofilele segmentate ale femeilor se pune în evidență un *apendice nuclear,* cu cromatina foarte densă, rotund sau ovalar, cu un diametru de 1—1,5 μm (vezi fig. 1 J). Acesta este atașat unui lob nuclear printr-un filament, luând forma de „băț de tobă". Apendicele nuclear sexual reprezintă unul din cei doi cromosomi X ai femeii. El poate servi, în unele sindroame intersexuale (de exemplu, sindroamele Turner și Klinefelter), la precizarea sexului, care poate fi considerat feminin când pe frotiu se găsesc cel puțin 6 „apendice nucleare" la 500 granulocite segmentate.

Citoplasma este de culoare roz pal, conținând un număr mare de granulații. La segmentatul neutrofil granulațiile specifice, secundare, colorate în brun, sunt greu de individualizat, formând uneori o masă compactă. Granulațiile primare, azurofile, sunt mai rare și au pierdut colorația caracteristică, putând fi recunoscute numai la microscopul electronic.

În toate granulocitele neutrofile de la metamielocit până la segmentatul matur se sintetizează granulații terțiare. Acestea sunt mai mici decât granulațiile primare și secundare, conțin fosfatază acidă, arilsulfatază și glicozaminoglicani sulfatați, dar sunt lipsite de peroxidaze. Se află în număr mai redus decât celelalte granulații la colorațiile citochimice. Studiile biochimice au indicat prezența de gelatinază și proteine receptori de membrană în aceste granulații.

Pe lângă granulațiile citoplasmatice, neutrofilele din ultimele stadii de maturație conțin numeroase vezicule, unele cu hidrolaze transportate din regiunea aparatului Golgi spre granulațiile terțiare. Altele conțin elastaze și fosfatază acidă leucocitară. De asemenea, în citoplasma neutrofilelor adulte există microtubuli și microfilamente cu rol important în endocitoză, secreția lizosomilor și în menținerea formei celulare.

Ultrastructural, mitocondriile sunt puține, ribosomii și reticulul endoplasmic rari, aparatul Golgi este rudimentar. Suprafața celulară este neregulată, cu numeroase cute.

Neutrofilul posedă receptori Fc pentru IgG și pentru componente ale complementului C3a și C5a, importanți pentru chemotaxie și CR1 și CR3 implicați în aderență și fagocitoză.

La temperatura corpului, neutrofilele segmentate prezintă mișcări ameboidale. Mișcarea se execută prin emiterea de pseudopode citoplasmatice lipsite de granulații. Masa de endoplasmă cu granulații se scurge în pseudopode, nucleul urmând pasiv celula. Deplasările celulei sunt de două feluri: „la întâmplare", dezordonate, la celula nestimulată, și „orientate" spre o anumită țintă, sub influența substanțelor chimiotactice.

Pe măsură ce mieloblastul se maturează în mielocit, metabolismul aerobic este convertit în anaerobic. Mitocondriile, numeroase la mielo-

blast, devin tot mai puține odată cu maturația și sunt rare în granulocitul matur. Conținutul de glicogen crește odată cu scăderea numărului de mitocondrii și glicogenul devine sursa de energie pentru metabolismul granulocitului matur. Activitatea oxidazică, esențială pentru funcția bactericidă a neutrofilului, apare la metamielocit, dar nu este pe deplin dezvoltată decât la segmentatul circulant.

CICLUL DE VIAȚĂ

Procesul complex al granulopoiezei are de parcurs două faze importante. Una este cea a celulelor progenitoare (celulă stem pluripotentă, CFC-GEMM, CFC-GM, CFC-G), celule neidentificabile morfologic, despre care se găsesc detalii în capitolul I. În acest capitol va fi prezentată numai a doua fază, de diferențiere, proliferare, maturare, stocare și circulație a celulelor seriei granulocitare neutrofile.

În ciclul de viață al celulelor seriei granulocitare neutrofile se disting mai multe etape: 1) etapa medulară, în care au loc procesele de proliferare, maturare și stocare a celulelor devenite adulte; 2) etapa sanguină, de transport a celulelor mature spre zonele unde sunt necesare; 3) etapa tisulară, de exercitare a funcțiilor specifice.

Etapa medulară are un timp de tranzit de 14 zile, distribuit între compartimentele de proliferare (mitotic) și cel de maturare și rezervă.

Compartimentul de proliferare. Din experimentele cu încorporare de timidină tritiată și din observarea directă în cultură, rezultă că celulele seriei granulocitare capabile de diviziuni sunt mieloblastul, promielocitul și mielocitul. Mieloblastul se divide o singură dată, promielocitul de una sau de două ori, iar mielocitul de două până la patru ori. În total, granulopoieza prezintă un număr de 4—7 mitoze de la mieloblast până la mielocit, ultima celulă cu potențial proliferativ. Timpul de sinteză a ADN este de 12 ore la toate elementele, dar, perioada G_1 fiind diferită, se ajunge la un timp de generare sau de tranzit de 18 ore la mieloblast, 24 de ore la promielocit și 104 ore la mielocit (12). Timpul de tranzit al întregului compartiment este de aproximativ 6 zile, iar mărimea compartimentului de $2{,}6 \times 10^9$ celule/kg corp (11).

Mielocitele sunt cele mai numeroase celule ale compartimentului, datorită numărului mai mare de generații succesive. Ele au o fază G_1 foarte lungă (36 de ore), ceea ce le permite creșterea producției, la nevoie, prin scurtarea acestei faze.

Compartimentul de maturare și rezervă. Mărimea populațiilor de celule (metamielocite, nesegmentate, segmentate) ce formează compartimentul de maturare și rezervă este aproximativ egală, fiecare având $2{,}5—3{,}6 \times 10^9$ celule/kg corp, sau 9×10^9 celule în totalitate (12). Timpul de tranzit al compartimentului este de 6—9 zile, dar în cursul infecțiilor acest timp de tranzit poate fi scurtat la 3 zile. Din rezervorul medular, unde stau în jur de 3 zile, neutrofilele mature pătrund în sânge în raport cu vârsta, cele cu vechime mai mare având prioritate.

Cinetica neutrofilelor sanguine. Neutrofilele din sânge se găsesc în două sectoare: neutrofile circulante și marginale. Investigațiile cu ^{32}PDF au demonstrat că cele două sectoare celulare sunt de mărimi egale (2).

Prin determinarea curentă de laborator a numărului de neutrofile se estimează numai neutrofilele circulante, deci jumătate din numărul total al neutrofilelor sanguine. Cealaltă jumătate este marginală, celulele aderând prin intermediul unor molecule de adeziune de endoteliul venulelor, înainte de a trece în țesuturi. Între cele două sectoare există un schimb permanent (18).

Numărul total de neutrofile din sânge — circulante și marginale — este de $0,7 \times 10^9$ celule/kg corp, foarte apropiat de producția zilnică de eritrocite (12). Aceasta înseamnă că în sânge există o cantitate de neutrofile reprezentând 10% din neutrofilele stocate în măduvă.

Timpul de tranzit în sânge al neutrofilelor a fost calculat de 6—9 ore, în funcție de metoda de studiu folosită (^{32}PDF sau ^{59}Fe). De aici rezultă că în 24 de ore toate neutrofilele din sânge se schimbă de 3—4 ori (6). Eliberarea din măduvă a neutrofilelor mature se realizează prin interacțiunea membranei neutrofilelor cu celulele endoteliale și membrana bazală a sinusurilor sanguine, controlată de factori stimulatori și de eliberare. Neutrofilele marginale pot fi atrase în circulație de exercițiul fizic, stres sau injectarea de adrenalină. Glucocorticoizii cresc numărul de neutrofile în sânge prin amplificarea eliberării celulelor din rezerva medulară și prin reducerea numărului de neutrofile ce ies din vase. Corticosteroizii nu cresc, așadar, în mod real producerea de neutrofile. Numărul mai mare de neutrofile obținut la determinările de laborator este datorat deplasării de neutrofile din măduvă și demarginalizării acestora. Reținerea neutrofilelor în circulație constituie unul din factorii predispozanți la infecții în cursul corticoterapiei. Acest defect este în bună parte evitat prin administrarea prednisonului la două zile, în doză unică.

Părăsind circulația, neutrofilele își încep adevărata activitate fiziologică, spre deosebire de eritrocite, care ies din sânge pentru a fi distruse. Trecând în țesuturi, neutrofilele nu mai revin în circulația sanguină. Sediul traversării peretelui vascular de către neutrofile este la nivelul venulelor postcapilare. Neutrofilele aderă și emit pseudopode, forțând trecerea prin sau printre celulele endoteliale sensibilizate prin reacții inflamatorii sau prin simplul contact cu neutrofilele. În mod normal, neutrofilele migrează către zonele de maximă expunere a organismului la contactul cu mediul extern, cum sunt tractusurile respirator, digestiv și urinar, pielea, cavitatea bucală, ficatul. Supraviețuirea neutrofilelor în țesuturi a fost aproximată la 4—5 zile (35).

REGLAREA GRANULOPOIEZEI NEUTROFILE

Diferențierea granulocitelor neutrofile începe cu CFC-GM și este completă la CFC-G (pentru detalii, vezi capitolul I). Aceasta este populația de celule progenitoare orientată către producerea de mieloblaști. Stimularea acestor celule progenitoare se face prin factori specifici — FSC-GM și FSC-G, care se fixează pe receptorii de suprafață ai celulelor. FSC-G este cel mai specific factor stimulator pentru neutrofile. Injectat *in vivo* produce creșterea numai a numărului de neutrofile, în timp ce FSC-GM stimulează producerea de neutrofile, dar și de eozino-

file și monocite. În plasma normală, nivelurile FSC-GM și FSC-G sunt foarte reduse. În stările infecțioase sau inflamatorii și în reacțiile imunologice sunt activate limfocitele T. Acestea stimulează macrofagele care, prin elaborarea de IL-1, induc creșterea producerii de factori stimulatori de către celulele endoteliale și fibroblaști (fig. VII.2). Chiar și în

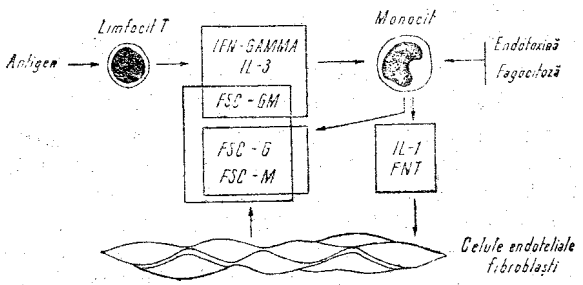


Fig. VII.2. — Sursele celulare și reglarea secreției de factori stimulatori ai coloniilor (după Cannistra S. A. și colab., Semin. Hematol. 1988; 25: 173).

IFN: interferon; IL: interleukina; FSC: factor stimulator al coloniilor; GM: granulomonocitar; G: granulocitar; M: monocitar; FNT: factorul necrozant al tumorilor.

aceste situații, nivelurile scăzute de FSC-GM stimulează formarea exclusivă de colonii macrofagice, în timp ce concentrații înalte duc la formarea de colonii neutrofile sau neutrofile-macrofage. Pe lângă acești factori stimulatori, acțiune sinergică în producerea de neutrofile are IL-6 (1).

Odată cu maturarea celulelor slăbesc legăturile acestora cu receptorii de pe fibrilele stromei, în final neutrofilele devenind libere, mobile. Acțiunea factorilor stimulatori are loc pe tot parcursul evoluției celulelor seriei, de la mieloblast până la celulele mature.

Un alt aspect al reglării producției de neutrofile îl reprezintă factorii frenatori, produși de macrofage și de neutrofilele mature (fig. VII.3). Acțiunea frenatoare a macrofagului se exercită prin eliberarea de prostaglandine E (PGE) care inhibă acțiunea FSC-GM la nivelul CFC-GM (23). Pentru a produce o colonie în prezența PGE, CFC-GM are nevoie de o cantitate de nouă ori mai mare de FSC-GM. Există deci o autoreglare exercitată de macrofag. Când nivelul de FSC-GM este ridicat, macrofagele secretă PGE, care inhibă acțiunea FSC-GM, diminuând astfel producția de neutrofile și de macrofage. Producerea de PGE este indusă atunci când este depășită o concentrație critică a FSC-GM. Cantitatea foarte mare de FSC-GM produsă în cursul infecțiilor, permite totuși depășirea acțiunii inhibitoare a PGE (24). Acțiunea inhibitoare a prostaglandinelor este mediată de AMP ciclic (38).

Polinuclearul neutrofil acționează inhibitor asupra mieloblastului și a celorlalți precursori granulocitari din compartimentul proliferativ. Acțiunea inhibitoare se exercită prin intermediul *chalonelor* (36), substanțe care au fost izolate și caracterizate din punct de vedere fizico-chimic (31). Acțiunea chalonelor ar completa un sistem *feed-back*, cu o buclă pozi-

tivă (FSC-GM şi FSC-G) şi cu alta negativă (chalonele) (30). Specificitatea chalonelor pentru celulele granulocitare a fost confirmată şi s-a arătat că limitarea producţiei de granulocite se face prin prelungirea timpului de ciclu celular (25), dar factorul (sau factorii) care acţionează nu a fost încă individualizat fizicochimic. De fapt, întreaga reglare a granulocitopoiezei poate fi reprezentată ca un sistem *feed-back* cu o buclă pozitivă (stimulatori) şi alta negativă (inhibitori), dezvoltat la nivelul macrofagului (32) (vezi fig. VII.3).

Rata de eliberare a neutrofilelor din măduva osoasă este influenţată de un factor umoral, numit *factorul de eliberare a neutrofilelor* şi de IL-1. În cursul infecţiilor bacteriene acute aceştia sunt stimulii de descărcare din rezervele medulare ale neutrofilelor.

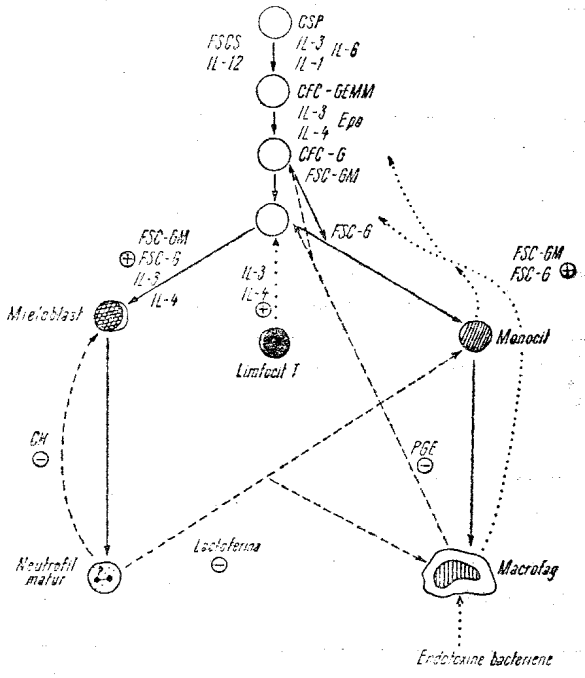


Fig. VII.3. — Reglarea granulopoiezei neutrofile.
FSCS: factorul stimulator al celulei stem; FSC-GM: factorul stimulator al coloniilor granulomonocitare; FSC-G: factorul stimulator al coloniilor granulocitare; IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-12: interleukine; PGE: prostaglandine E; Epo: eritropoietină; CH: chalone; .....> ⊕; acţiune stimulatoare; -----> ⊖: acţiune inhibitoare.

FUNCŢIILE GRANULOCITELOR NEUTROFILE

Neutrofilele îndeplinesc o funcţie de apărare prin fagocitoză şi una de secreţie.

Fagocitoza. Funcţia principală a neutrofilului este de apărare a organismului contra infecţiilor prin fagocitarea germenilor microbieni. Fagocitoza neutrofilului reprezintă prima linie de apărare a organismului. Ea este un proces complex la care participă factori celulari şi extracelulari (tabelul 7.I).

Dintre *factorii extracelulari* o importanţă deosebită o au *substanţele leucotaxice*. În afară de bacterii, produse bacteriene (N-formilpeptide) şi complexe antigen-anticorp, numeroase alte substanţe atrag neutrofilele: produse ale degradării tisulare (în special ale colagenului şi fibrinei), en-

TABELUL 7.1

Etape ale funcției de apărare a neutrofilului

Răspunsul neutrofilului	Mecanisme fiziologice
1. Mobilizare	Eliberare rapidă a rezervelor medulare prin IL-1 și demarginarea neutrofilelor sanguine prin adrenalină și corticoizi
2. Producere crescută	Eliberarea CFC-GM și CFC-G de către celule endoteliale și limfocite T
3. Activare	Număr și afinitate crescută a receptorilor chemotactici; polarizarea receptorilor chemotactici. Activatori C5a, leukotriene B_4, FSC-GM
4. Aderență la endoteliu și la matricea extracelulară	Interacțiune între receptori de adeziune leucocitari (integrine, selectine) și receptori de adeziune endoteliali (ICAM-1, CD54, ELAM-1, VCAM-1) Aderență la fibronectină, colagen, hialuronat prin receptori de adeziune specifici
5. Penetrare (diapedeză)	Traversarea printre celulele endoteliale
6. Mișcarea direcționată (chemotaxie)	Receptorii de membrană pentru formilmetronilleucil fenilalanină, proteine ale gazdei (fibronectină, kalicreină), mediatori ai inflamației (IL-1, LTB4, C5a) facilitează mișcarea. Virusurile inhibă chemotaxia
7. Atașarea bacteriei	Receptorii Fc și C3b ajută opsonizarea. Fibronectina favorizează atașarea
8. Ingestie	Învelirea cu IgG, complement și fibronectină favorizează ingestia
9. Omorâre	Catepsina G, defensine, factorul inductor al permeabilității bacteriene. Superoxidul H_2O_2, halid sunt introduși în fagosomi
10. Secreție	Produșii neutrofilului sunt eliberați în mediu. Fragmentele de fibronectină sunt chemotactice pentru monocit. Radicalii de oxigen toxici și enzime omoară celulele din vecinătate, eliberând noi factori chemotactici

zime ale coagulării și fibrinolizei (de exemplu, activatorul plasminogenului), mediatori ai inflamației (kalicreina). În recrutarea și migrarea granulocitelor circulante spre un focar, de obicei inflamator, intervin trei procese: 1) *Atragerea* lor prin agenți chemotactici sau chemotractanți, care sunt numeroși, unii eliberați de celule din focarul inflamator,

cum sunt LTB4, PAF, FCN (factorul chemotactic neutrofil), alții prezenți în sânge, cum este C5a. 2) *Marginalizarea* și *aderarea* granulocitelor de celulele endoteliale, în special din venulele postcapilare, printr-un mecanism ce implică două grupe de molecule de adeziune, unele exprimate pe granulocite, reprezentate de două familii: integrine (îndeosebi ICAM-1=molecula intercelulară de adeziune 1) și selectine (ELAM-1) și a doua grupă, a liganților (molecule de adeziune) exprimați de celulele endoteliale, cum este VCAM-1 (moleculă celulară vasculară de adeziune). 3) *Dirijarea* leucocitelor în sens corect, către focarul inflamator, este asigurată de chemokine, un grup de molecule recent identificate, din care până în prezent sunt cunoscute la om 18, împărțite în 2 subfamilii: chemokinele α sau CXC, care includ IL-8 și factorul plachetar 4, cu acțiunea atractantă și activatoare pentru neutrofile, dar nu și pentru monocite, și chemokinele β sau CC, ce includ proteina chemotactică monocitară 1 (MCP-1) și proteina inflamatorie macrofagică 1 (MIP-1), cu acțiune chemoatractantă pentru monocite (1 a). Leucotaxic specific pentru neutrofil este complexul trimolecular C567, activat de către bacterii, proteaze nespecifice sau prin intermediul sistemului properdinic. Neutrofilele eliberează un factor imobilizator, care împiedică alte neutrofile să părăsească zona inflamației.

O condiție prealabilă pentru fagocitoză este opsonizarea agentului bacterian care constă în fixarea pe acesta de opsonine; acestea sunt molecule de IgG sau de complement.

Opsoninele sunt componente ale serului care se atașează de bacteria invadatoare, favorizând leucotaxia și ingestia bacteriei. Dintre opsonine mai importante sunt imunoglobulinele IgG și componentul C5 activat. Acestea se leagă de situsurile pentru Ig și/sau complement de pe suprafața bacteriei și a neutrofilului, realizând punți prin care neutrofilul aderă la bacterie. Atașarea anticorpului de particula țintă se face la nivelul regiunii Fab, iar prin segmentul Fc se activează neutrofilul.

Recent a fost izolată din ser leucokinină, a cărei activitate de favorizare a fagocitozei este conținută într-un peptid, *tuftsin*. Faptul că tuftsinul este sintetizat în splină ar putea explica în parte susceptibilitatea la infecții a persoanelor splenectomizate și a celor cu splina afectată de un proces leucemic.

Fagocitoza este un proces care are trei etape: leucotaxia (leucotropismul), ingestia (endocitarea) și bactericidia (digestia).

Nu este cunoscut modul exact în care se exercită *leucotaxia*, adică direcționarea mișcării neutrofilului către particula de fagocitat. Totuși, se știe că agenții leucotaxici trebuie să se afle în gradient de concentrație pentru a stimula celula. Se admite că leucotaxia exprimă capacitatea neutrofilului de recunoaștere a non-self-ului și a self-ului alterat.

Deplasarea neutrofilului spre sursa leucotaxică se realizează prin emiterea de pseudopode pe direcția de înaintare. Pseudopodele care se află în partea frontală a celulei conțin nucleul și granulațiile citoplasmatice (protopod), iar în spatele celulei în mișcare se formează o coadă citoplasmică (uropod). Pseudopodele conțin o rețea filamentoasă din fibre de actină, activată de calciu și miozină. Energia de concentrație este furnizată de ATP. Pentru mișcare, neutrofilul proiectează o porțiune de ci-

toplasmă clară, protopodul, în direcția de deplasare, în timp ce capătul opus al celulei rămâne atașat la suport (de obicei, celula endotelială) cu ajutorul unor filamente. Odată fixat protopodul, uropodul se detașează și celula se contractă în direcția protopodului, luând forma rotundă.

Viteza de deplasare a granulocitelor este în medie de 19—35 μm/min și este influențată de pH, temperatură și presiunea osmotică ambiantă, de tensiunea superficială și de sarcina electrică a celulelor.

Etapa următoare a fagocitozei este *ingestia particulelor* ce au atras neutrofilul. Când ajunge în apropierea particulei fagocitabile, neutrofilul emite pseudopode care o înconjură, formând o veziculă citoplasmatică, digestivă, căptușită cu membrana celulară invaginată. Imediat după înglobare, granulațiile citoplasmatice, vacuole conținând substanțe bactericide, fuzionează cu vezicula digestivă formând fagosomul, care inițiază *etapa bactericidă* a fagocitozei. Mai întâi, granulațiile neutrofile secundare își varsă conținutul de fosfatază alcalină, lizozim și lactoferină în interiorul fagosomului. Ulterior, se deschid în lizosom granulațiile primare, azurofile, care aduc hidrolaze acide, peroxidaze și proteaze active la pH neutru: elastază, chimotripsină și colagenază. În acest fel, citoplasma din jurul fagosomului este degranulată, cu menținerea intactă a granulațiilor de la distanță.

Distrugerea organismului ingerat este, în primul rând, un proces dependent de oxigen. Activarea neutrofilelor de către stimulii chemotactici sau atașarea la bacterii este asociată cu o creștere intensă a consumului de oxigen. Pe de altă parte, crește glicoliza pentru a oferi energia necesară chimiotaxiei, aderării și înglobării particulelor. De asemenea, stimularea glicolizei produce scăderea pH-ului celular. Pe de altă parte, crește consumul de oxigen și activitatea șuntului hexozomonofosfat, legate de acțiunea bactericidă. În timpul activării respirației celulare ia naștere radicalul superoxid, care este foarte toxic nu numai pentru bacterii, ci și pentru celule; pentru inactivare intervine superoxid dismutaza, care transformă superoxidul cu formare de oxigen molecular și peroxid de hidrogen (H_2O_2). Acesta din urmă, de asemenea toxic pentru celulă, este desfăcut în apă și oxigen molecular. Totodată, H_2O_2 reacționează cu mieloperoxidaza și cu halogeni intracelulari, ducând la formarea de substanțe bactericide. Sistemele bactericide neoxidante sunt reprezentate de protează, care degradează proteolitic componentele microbiene; lizozimul acționează bacteriolitic prin desfacerea peptidoglicanilor din peretele microbian, iar lactoferina acționează bacteriostatic prin fixarea fierului necesar creșterii bacteriilor. Când bacterioliza este terminată, fagosomul ia contact cu membrana celulară, fuzionează cu aceasta și se deschide spre exterior. Totodată, membrana care delimita fagosomul este reîncorporată în membrana celulei.

După fagocitoza microorganismelor, granulațiile specifice (lizosomii) dispar din granulocitele neutrofile și eozinofile. Streptolizina produce o liză imediată a granulațiilor din granulocitele neutrofile, cu eliberarea enzimelor ce le conțin, ceea ce duce la autoliza și moartea celulelor respective, cu eliberarea de substanțe pirogene.

Activități secretoare ale neutrofilelor. Neutrofilul produce și secretă în mod activ transcobalamina I, alfa$_1$-globulină care fixează și transportă

vitamina B_{12} în ser. Transcobalamina I are valori mult crescute în leucemia granulocitară cronică, metaplazia mieloidă și policitemia vera. În leucopeniile cronice și anemiile aplastice ea scade semnificativ. Astfel, se pare că nivelul seric al transcobalaminei I este direct proporțional cu masa totală a neutrofilelor.

PATOLOGIA GRANULOCITELOR NEUTROFILE

ANOMALII CALITATIVE

Neutrofilia. Prin neutrofilie se înțelege creșterea numărului de neutrofile peste limita maximă normală (7—8 000/μl). De cele mai multe ori, numărul de neutrofile crește moderat la 10—20 000/μl, la început prin mobilizarea rezervelor medulare, iar, mai târziu, prin creșterea producției de granulocite. Uneori, numărul de neutrofile ajunge la 50—60 000/μl; s-au semnalat și cazuri depășind 100 000 neutrofile/μl. În această situație, neutrofilia este însoțită de apariția în circulație a formelor imature de granulocite, mai întâi metamielocite, apoi mielocite și rareori promielocite. Un asemenea tablou poartă numele de *reacție leucemoidă cu neutrofilie*. În laborator, reacția leucemoidă cu neutrofilie poate fi diferențiată de leucemia granulocitară cronică printr-un număr mai mic de neutrofile imature, lipsa numărului crescut de bazofile, fosfataza alcalină leucocitară intens pozitivă, lipsa cromosomului Ph_1 și nivelul normal al vitaminei B_{12} în ser.

Cea mai frecventă cauză a neutrofiliei este reprezentată de infecțiile și inflamațiile acute. Cu toate acestea, în unele infecții acute — ca febra tifoidă, parotidita epidemică, rujeola și cele mai multe din infecțiile virale — nu se găsește neutrofilie. Apariția acesteia este un semn de complicație cu germeni infecțioși capabili să inducă o producție crescută de neutrofile. Dintre bolile infecțioase acute cu exantem, neutrofilia cea mai mare apare în scarlatină.

Printre cauzele neutrofiliilor citățm pe cele mai importante (tabelul 7.II).

Neutrofilia din arsuri, infarct miocardic și din primele 24 de ore după intervențiile chirurgicale este datorată leziunilor tisulare întinse cu resorbție de pirogeni. Un număr mare de neutrofile apare în hernia strangulată complicată cu peritonită. Cristalele de acid uric ingerate de neutrofilele pacienților gutoși provoacă ruptura membranei fagosomilor, cu revărsarea enzimelor hidrolitice în celulă și în jurul ei, atrăgând, astfel, alte neutrofile spre focarul inflamator gutos. Leziunile tisulare sunt și la originea neutrofiliei din uremie, traumatisme, reacții alergice (boala serului), intoxicații.

Toxicele chimice și unele medicamente produc neutrofilie după o acțiune de scurtă durată. Acest efect poate fi explicat prin necroze tisulare, vomă, convulsii și reacții de hipersensibilitate. Aceleași substanțe, acționând timp îndelungat, dau neutropenie.

Tumorile maligne prezintă deseori neutrofilie datorită necrozelor intratumorale și/sau suprainfecțiilor. Au mai fost incriminate metastazele intramedulare și producerea de către tumoră a unor substanțe cu ac-

țiune stimulatoare asupra măduvei. În general, o reacție neutrofilă poate apărea în cursul oricărei tumori, dar mai adeseori în tumorile gastrice, bronșice, pancreatice, ale sistemului nervos și în limfoame.

Prin mobilizarea neutrofilelor marginate, cu menținerea neschimbată a numărului total de leucocite din sânge, se realizează o neutrofilie falsă *(shift neutrophilia).*

TABELUL 7.II

Cauzele neutrofiliilor

1) *Infecții* acute, localizate sau generalizate, cu bacterii (coci, bacili, micobacterii), fungi, spirochete, paraziți, protozoare (malarie), rickettsii, unele virusuri.
2) *Inflamații:* artrită reumatică, vasculită, miozite, nefrite etc.; boli vasculare de colagen; infarct miocardic; gută, reacții de hipersensibilitate.
3) *Stări fiziologice:* eforturi fizice mari, nou-născut, graviditate.
4) *Factori fizici:* frig, căldură, convulsii, traumatisme, arsuri, șoc electric, anoxie, tahicardie paroxistică.
5) *Factori psihici:* teamă, exaltare, furie.
6) *Intoxicații:* a) metabolice — uremie, acidoză diabetică, eclampsie, necroză hepatică, hipertiroidie; b) substanțe chimice și medicamente; plumb, benzen, etilenglicol, proteine străine (peptină, cazeină etc.), digitală, heparină, corticosteroizi, serotonină, histamină, acetilcolină, fenacetină, antipirină.
7) *Hemoragie acută.*
8) *Hemoliza acută,* inclusiv posttransfuzională.
9) *Tumori:* carcinom bronșic, gastric, uterin, pancreatic, limfoame (îndeosebi boala Hodgkin), tumori cerebrale, melanom.
10) *Boli de sânge:* leucemie granulocitară cronică, policitemie vera, mielofibroză; după începerea tratamentului anemiei megaloblastice; în perioada de refacere după agranulocitoză; postsplenectomie.
11) *Neutrofilia cronică idiopatică.*

Caracteristice pentru acest tip de neutrofilie sunt: durata scurtă de 15—20 de minute, valorile moderate ale numărului de neutrofile și lipsa creșterii numărului de nesegmentate.

Neutrofilia adevărată este rezultatul creșterii numărului total de neutrofile din sânge prin eliberarea unei cantități mai mari de neutrofile din măduvă. Nivelul neutrofiliei nu are întotdeauna valoare prognostică în infecții. Pe lângă numărul de neutrofile, de mare importanță este examinarea morfologiei neutrofilului. Prezența de granulații toxice, vacuole sau bazofilia citoplasmei indică un prognostic sever.

Neutropenia. Prin neutropenie se înțelege scăderea numărului de neutrofile sub 1 500/ml (sau sub 2×10^9/l). Pericolul iminent de infecții apare la un număr de neutrofile mai mic de 1 000/ml și devine sever la mai puțin de 500/ml. Pericolul poate fi uneori mai scăzut, datorită unei monocitoze compensatoare. În practică, termenul de neutropenie se suprapune peste cel de granulocitopenie.

Ca și în cazul neutrofiliei, neutropenia poate fi falsă sau adevărată. *Neutropenia falsă (shift neutropenia)* rezultă dintr-o marginare exagerată a neutrofilelor și poate fi pusă în evidență prin proba la efort. Cel mai adesea *neutropenia* este *adevărată,* cu scăderea numărului total de neutrofile (circulante și marginate).

Se cunosc două mecanisme de producere a neutropeniei adevărate:

1) Producție scăzută de neutrofile datorită: a) unei proliferări medulare reduse, cu apariția în sânge a câtorva neutrofile imature și uneori a unui număr crescut de monocite (această situație este întâlnită în invadarea măduvei cu celule străine, după iradiere, citostatice, radiomimetice și antimetabolice, derivate de fenotiazină); b) granulocitopoiezei ineficiente, caracterizată prin distrucția intramedulară a unei părți considerabile din precursorii neutrofilelor. Pe frotiurile de măduvă osoasă neutrofilele sunt în număr crescut, cu predominanța formelor imature, uneori de macrocitoză și cu vacuole citoplasmatice. În periferie, neutrofilele sunt mari și hipersegmentate. Prototipul granulocitopoiezei ineficiente este deficiența de vitamină B_{12} și acid folic.

2) Reducerea duratei de supraviețuire în circulație a neutrofilelor prin: a) accelerarea trecerii în țesuturi a neutrofilelor în infecții și inflamații; b) distrugerea neutrofilelor de către anticorpi, în hipersplenism sau ca urmare a defectelor de maturație. În aceste cazuri nu se observă monocitoză compensatoare.

De cele mai multe ori, cele două modalități patogenice, centrală și periferică, se combină în producerea unei neutropenii. În limfoame, de exemplu, acționează simultan invadarea măduvei, consumul mare de neutrofile prin infecții și uneori hipersplenismul.

Cauzele neutropeniilor sunt multiple (tabelul 7.III).

TABELUL 7.III

Cauzele neutropeniilor

1. *Infecții bacteriene:* febra tifoidă și paratifoidă, bruceloza; *virale:* gripa, rujeola, hepatita, rubeola, varicela, parvovirus, SIDA; *rickettsii:* tifos exantematic; *protozoare:* malaria, toxoplasmoza, kala-azar; *infecții grave:* septicemie, tuberculoza miliară la persoane debilitate.

2. *Agenți fizici, chimici și medicamente:* a) doze mari de radiații ionizante, benzen, citostatice producând hipo- sau aplazie medulară, în toate cazurile; b) unele medicamente: sulfamide, piramidon, fenilbutazonă, anticonvulsivante, antitiroidiene, indiferent de doză, în funcție de sensibilitatea individuală.

3. *Boli cu scăderea producției medulare de neutrofile* prin: a) granulopoieză ineficientă (deficiența de vitamină B_{12} și acid folic); b) infiltrarea măduvei (leucemii, cancere, mielofibroză); c) anemii aplastice; d) congenitale (rare): neutropenie ereditară, neutropenie ciclică familială, sindroame mielodisplazice.

4. *Boli asociate cu creșterea distrucției de neutrofile:* a) imune: prin izoanticorpi — neonatal sau după transfuzii de sânge; prin autoanticorpi — lupus eritematos diseminat, limfoame, artrită reumatoidă, șoc anafilactic; b) mecanic: hemodializă; c) hipersplenism.

5. *Sechestre intravasculare:* a) în plămân (leucoaglutinare mediată de complement; b) în splină (hipersplenism).

6. *Stări cașectice și debilitate:* malnutriție, alcoolism.

În practică, se fac numărători repetate ale celulelor sanguine pentru a se stabili dacă neutropenia este de durată și dacă nu se însoțește de alte citopenii. Un bun indicator al cantității totale de neutrofile din organism este nivelul capacității de legare a vitaminei B_{12}. Investigarea cauzelor unei neutropenii se face prin: a) examinarea sângelui din punct

de vedere morfologic (cantitativ și calitativ), imunologic (test Coombs, aglutinine la rece, test pentru celulele LE), biochimic (teste funcționale hepatice, acid uric), bacteriologic (culturi); b) examenul măduvei osoase (citologic, histologic, culturi bacteriene și de fungi); c) studiul neutrocinetic cu ^{51}Cr sau ^{32}PDE pentru a se putea deosebi o subproducție de neutrofile de o distrucție excesivă sau de o sechestrare splenică sau pulmonară; d) studiul morfologic și funcțional al splinei și ficatului; e) anamneza detaliată cu privire la expunerea la radiații ionizante și toxice sau medicamente; f) studiul familial.

Neutropenia limitează posibilitățile terapeuticii cu medicamente citotoxice. De aceea, se fac tratamente intense pentru recuperarea cât mai rapidă a pacienților. Pe lângă administrarea cu precauție, dată fiind toxicitatea sa, de carbonat de litiu (300 mg×3/zi), activator al producerii de factori stimulatori, ai neutrofilelor, sunt posibile tratamente, în neutropeniile severe ce amenință viața pacientului, cu factori stimulatori recombinanți — FSC-GM, FSC-G și IL-3 (vezi capitolul I). Corticoizii și/sau azatioprina ori ciclofosfamida sunt utili în neutropeniile autoimune și splenectomia în cazurile cu hipersplenism și măduvă osoasă funcțional normală (16).

ANOMALII CALITATIVE

Aceste anomalii pot fi congenitale sau dobândite, intrinseci sau extrinseci neutrofilului. În toate cazurile, defectele calitative ale neutrofilului duc la alterări ale fagocitozei.

ANOMALII CONGENITALE

În agammaglobulinemia congenitală de tip Bruton a fost pusă în evidență incapacitatea de endocitare a unor germeni, ca pneumococi, colibacili, stafilococi albi, rezultat al diminuării activității opsonizante a serului. Deficitul de ingestie din asplenia congenitală explică infecțiile grave prezente în această afecțiune.

Deficitele lizei microbiene sunt cele mai severe. Acestea caracterizează *granulomatoza cronică familială.* Boala este ereditară, cu transmitere recesivă legată de cromosomul X. Este afectat numai sexul masculin. Femeile purtătoare ale defectului sunt detectate ca urmare a înjumătățirii valorilor testului cu nitro-blue tetrazolium. Boala debutează în primii ani de viață cu infecții și supurații ale tegumentelor, ale căilor respiratorii superioare, ale ganglionilor superficiali, ficatului, plămânilor, mai rar ale splinei și oaselor. Infecțiile se produc mai mult cu germeni care conțin catalază și în special cu stafilococi, enterobacterii gram-negative (E. coli, *K. pneumoniae,* Serratia) și fungi (Aspergillus, Nocardia), dar aproape niciodată cu pneumococi, *Haemophilus influenzae* și streptococi. Leziunile cutanate se prezintă de obicei ca piodermită, acnee pustuloasă sau eczemă infectată. Supurațiile ganglionare cu evoluție cronică amintesc adenopatiile tuberculoase. După câțiva ani de evoluție apare hepatosplenomegalia; ficatul poate fi sediul unei supurații. Boala este letală în câțiva ani de evoluție; puține din cele aproximativ 100 de cazuri semnalate în literatură au depășit vârsta de 15 ani.

Pacienții sunt indemni din punctul de vedere al imunității umorale și celulare. Singurul defect decelabil este absența capacității bactericide a neutrofilelor. Din punct de vedere cantitativ, neutrofilele sunt normale, reacționând cu neutrofilie în cursul puseelor infecțioase. Anomalia metabolică responsabilă de bactericidia anormală a neutrofilelor constă într-un deficit al metabolismului lor oxidativ, cu scăderea sau absența de radicali oxizi, ca răspuns la diverși stimuli, inclusiv agenți patogeni.

Diagnosticul de certitudine este stabilit prin testul de reducere al nitro-blue tetrazolium (NBT). Acesta este negativ în neutrofilele bolnavilor și cu valori scăzute la persoanele purtătoare ale anomaliei.

Nu există un tratament etiologic al bolii. Corticoterapia poate frâna procesul granulomatos, dar comportă riscul diseminării septice atenuat întrucâtva de antibiotice. Recent s-a arătat că interferonul γ reduce incidența infecțiilor grave.

Au fost semnalate variante ale granulomatozei cronice familiale, toate caracterizate prin același defect în activitatea bactericidă a neutrofilelor: sindromul lui Iov, histiocitoza lipocromică și deficitul de glutation peroxidază.

Pacienții cu *deficiență* severă de *glucozo-6 fosfat dehidrogenază* (G-6-PD) prezintă o anemie hemolitică și un defect funcțional al neutrofilelor. Acestea nu sunt capabile de bactericidie din cauza cantităților reduse de G-6-PD, care împiedică formarea de substanțe reducătoare necesare în cursul activării respirației celulare. Tabloul clinic este similar cu cel al granulomatozei cronice.

Deficiența de mieloperoxidază din granulațiile neutrofile și din monocite, nu însă din eozinofile, este o boală moștenită autosomal recesiv (22). Defectul de liză bacteriană nu este atât de pronunțat ca în granulomatoza cronică, deoarece neutrofilele cu deficit de mieloperoxidază acumulează mai mult peroxid de oxigen decât neutrofilele normale (15). Infecțiile cu candida sunt mai frecvente, în special la cei ce au și diabet zaharat.

ANOMALII DE STRUCTURĂ CELULARĂ

Sindromul Chediak-Higashi este datorit unui defect în producția de lizosomi. Morfologic se pun în evidență granulații citoplasmatice gigante în neutrofile, monocite, limfocite, trombocite și melanocite. Caracteristică este disfuncția celulară generalizată, manifestată prin fuziunea granulațiilor citoplasmatice. Albinismul oculocutanat al bolnavilor poate fi detectat de la naștere și este rezultatul agregării patologice a melanosomilor. Susceptibilitatea crescută la infecții a pacienților (abcese profunde, sinuzite, pneumonii ș.a.), dificil tratabile și uneori letale este explicată prin degranulare și chemotactism defectuos. Alte trăsături ale bolii sunt neutropenia, trombocitopenia ce produce sângerări, cu prelungirea timpului de sângerare, deficitul în activitatea limfocitelor NK, febră recurentă și neuropatie centrală și periferică (7).

La bolnavii care au supraviețuit mai mult timp urmează adesea o a doua fază gravă, accelerată a bolii, caracterizată printr-o infiltrație limfohistiocitară cu aspect limfomatos în ganglioni, măduva osoasă, fi-

cat, splină, cu mărirea organelor respective și cu transformarea neutropeniei moderate într-o pancitopenie progresivă severă, care nu a putut fi oprită prin diversele tentative terapeutice (chimioterapie, splenectomie, transplant de măduvă osoasă) efectuate.

Diagnosticul este precizat prin prezența aproape patognomonică de granulații gigante în neutrofile și eozinofile.

Anomalia constituțională Alder este caracterizată prin prezența de granulații azurofile mari și numeroase în neutrofile, eozinofile și bazofile. Pot fi interesate și unele monocite și limfocite. Numărul mare de granulații poate ascunde nucleii celulelor.

Anomalia Pelger-Huët constă în prezența de nuclei bilobați sau în formă de haltere în granulocitele neutrofile mature. Este o condiție benignă moștenită ca o trăsătură autosomală dominantă, neasociată cu o incidență crescută a infecțiilor. La pacienții homozigoți, nucleii neutrofilelor sunt rotunzi. Dacă anomalia este dobândită (în sindroame mieloproliferative, sindroame mielodisplastice) poartă numele de anomalie „pseudo-Pelger-Huët".

Anomalia May-Hegglin (tulburare de maturare polifilă), de asemenea moștenită ca o trăsătură autosomală dominantă, este caracterizată prin prezența de incluziuni citoplasmatice mari în granulocite și monocite. Incluziunile seamănă cu corpii Döhle din stările infecțioase, dar sunt prezente în aproape toate neutrofilele. Deși pacienții au, în același timp, și neutropenie, ei nu prezintă un risc crescut la infecții. În schimb, trombocitele sunt mari și au defecte funcționale care pot fi cauza unui sindrom hemoragic de tip petesial, în care timpul de sângerare este prelungit și retracția cheagului tulburată.

Deficitul de adeziune leucocitară I (LAD I) a fost descris la bolnavi care prezintă un deficit genetic de expresie a integrinei cD18 și ale cărui caractere principale sunt: infecții bacteriene grave repetate și absența neutrofilelor la nivelul leziunii infectate, deși ele sunt în număr mare în circulație (20a).

ANOMALII DOBÂNDITE

Defecte intrinseci neutrofilului au fost observate în leucemiile acute și cronice. Acestea constau în anomalii ale mobilizării, adezivității, înglobării de particule și activități bactericide ale neutrofilelor. S-a observat o corelație strânsă între fagocitoza deficitară din leucemia acută și perioadele cu infecții manifeste. Atât în leucemia acută mieloblastică, cât și în cea mielomonocitară au fost puse în evidență diminuări ale activității mieloperoxidazice și bactericide. Aceleași observații au fost găsite valabile și pentru leucemia acută limfoblastică. Funcțiile neutrofilelor au fost găsite, de asemenea, anormale în sindroamele mieloproliferative. Granulocitele acestor pacienți au o chemotaxie, activitate mieloperoxidazică, fagocitoză și testul NBT deficitare (29).

O fagocitoză deficitară prin defect intrinsec, o tulburare a chemotactismului și un deficit de receptor Fc au fost demonstrate și în hemoglobinuria nocturnă paroxistică, precum și în anemia megaloblastică.

În siclemie, activitatea bactericidă și fagocitară a neutrofilelor este tulburată.

Sindromul leucocitelor leneșe (lazy leucocyte syndrome) se caracterizează prin neutropenie, cu număr normal de precursori în măduvă. Neutrofilele prezintă o mobilitate redusă la solicitarea stimulilor inflamatori. Se pare că aceste anomalii sunt urmarea unei eliberări defectuoase a neutrofilelor din măduvă (17). Manifestările clinice mai importante sunt rinite, otite medii recidivante, gingivite, stomatite.

Defecte extrinseci neutrofilului. Dintre acestea citǎm în primul rând pe cele din diabetul zaharat, care constau într-o întârziere a mobilizării neutrofilelor și un răspuns chimiotaxic redus. Această anomalie este corectabilă prin incubarea *in vitro* a neutrofilelor în prezența insulinei.

Sensibilitatea la infecții a bolnavilor cu uremie poate fi explicată, cel puțin în parte, printr-o mobilizare redusă și o fagocitoză defectuoasă a neutrofilelor. De asemenea, pacienții cu mielom sau macroglobulinemie prezintă defecte ale neutrofilelor de mobilizare, adezivitate și înglobare microbiană.

Unele medicamente intervin în diverse etape ale fagocitozei: colchicina, agenți antiinflamatori ca fenilbutazona, indometacinul, clorochinina, corticosteroizii și antibioticele.

Alcoolul și arsurile severe induc defecte ale fagocitozei cu favorizarea infecțiilor.

Neutrofilele pot fi activate și din alte cauze, cu efecte patogene. Activarea complementului prin expunerea sângelui la un material străin (membrana aparatului de dializă renală) induce agregarea neutrofilelor în plămân, cu dispnee și durere toracică. Neutrofilele pot fi o cauză importantă a lezării miocardului ischemic, reperfuzat. Sindromul afectării respiratorii a adultului (ARDS), postoperator sau septic, poate fi rezultatul produșilor plachetari, factorilor de coagulare (fibrina) și componenților complementului, care determină neutrofilele să agreseze endoteliul vascular pulmonar.

SERIA GRANULOCITARĂ EOZINOFILĂ

Eozinofilele reprezintă un grup distinct, morfologic și funcțional de granulocite. Originea tuturor granulocitelor este comună până la nivelul precursorilor unipotenți. Seria eozinofilă își are celula sa de origine, CFC-Eo. Cu toate acestea, aspectul mieloblastului și al promielocitului este identic cu al celorlalte granulocite. Abia apariția granulațiilor specifice eozinofile în stadiul de mielocit face posibilă recunoașterea celulelor seriei.

MORFOLOGIA GRANULOCITELOR EOZINOFILE

Mielocitul eozinofil nu diferă ca formă, mărime și aspect al nucleului de mielocitul neutrofil. Elementele esențiale sunt granulațiile eozinofile. Acestea sunt mari, egale între ele, rotunde, colorate în roșu-portocaliu. Ultrastructural, granulațiile eozinofile măsoară 0,5—1,5 μm, fiind

compuse dintr-un corp central dens, cristalin, înconjurat de o matrice mai puțin densă și de o membrană cu strat dublu. La o rezoluție înaltă, corpul cristalin se prezintă ca o textură cu o periodicitate a fibrelor componente de 40 Å. Granulele cristaline conțin depozitate cele patru proteine bazice ale eozinofilului: proteina bazică majoră, proteina cationică eozinofilă, neurotoxina derivată din eozinofil și peroxidaza eozinofilică. Prima se află în corpul dens, iar celelalte trei în matricea din jur. Proteina bazică majoră este bogată în arginină și are un rol semnificativ funcțional și patologic, putând produce leziuni ale endocardului și disrupția integrității celulelor epiteliale respiratorii la pacienții cu astm. În matricea granulației sunt prezente proteine cationice eozinofile care se colorează cu coloranți acizi, cum este eozina, și care sunt capabile să activeze factorul Hagemann și plasminogenul, cu producerea de fenomene tromboembolice. Granulațiile eozinofile conțin, de asemenea, peroxidaze, fosfataze acide, colagenază, histaminază, catalază, fosfolipază S, esteraze, arilsulfatază B și alte enzime lizosomale. Peroxidazele eozinofilice diferă de mieloperoxidazele neutrofilului prin aceea că în prezența iodului și a peroxidului de hidrogen au acțiune helmintoxică.

Metamielocitul și *nesegmentatul eozinofil* nu au caracteristici deosebite.

Segmentatul eozinofil are de obicei doi lobi nucleari, uneori greu vizibili din cauza granulațiilor specifice, în număr de circa 200, cu diametrul de 0,3—0,7 μm, care acoperă întreaga citoplasmă.

Eozinofilul exprimă un mare număr de receptori de membrană prin care comunică cu mediul extracelular, servind la recunoașterea de imunoglobuline, de mediatori solubili și de structuri insolubile. Principalii receptori sunt:

— receptori pentru imunoglobuline G, A și D. Eozinofilul se leagă de asemenea de IgE în mod specific, având un rol major în distrugerea unor paraziți, dar natura acestei legături nu este încă precizată;

— receptori pentru mediatori solubili cum sunt: PAF, LtB4, IL-5;

— receptori pentru unele fracțiuni ale complementului, cum sunt C3b, C3bi, C4 ș.a.;

— o categorie importantă de receptori sunt receptorii de adeziune, care, ca și pentru neutrofile, au rol în migrarea leucocitelor din spațiul vascular în cel extravascular, migrare în care primul pas constă în aderarea lor de endoteliul postvenular. Acest pas este rezultatul interacțiunii între receptorii de adeziune leucocitari și moleculele de adeziune (ICAM-1, Elam-1 și VLAM-1) de pe celulele endoteliale. Receptorii de adeziune fac parte din familia integrinelor și familia selectinelor;

— eozinofilele, ca și neutrofilele, pot să adere prin receptori specifici și de proteinele matricei extracelulare, ca fibronectina, colagenul, hialuronatul.

Membrana plasmatică este bogată în lizofosfolipaze, enzime care pot cristaliza și forma cristalele Charcot-Leyden în urma dezintegrărilor masive de eozinofile. Eozinofilele au capacitatea de a genera leucotriene pe calea lipo-oxigenazei și prostaglandine pe calea ciclo-oxigenazei.

CINETICA EOZINOFILELOR

CFC-Eo, celula progenitoare orientată eozinofilic, este stimulată pentru proliferare, diferențiere și maturare de IL-5 sau factorul II de creștere a limfocitelor B, care este totodată și citokina majoră implicată în producerea eozinofiliei. Ea este produsă de limfocitele T și își are gena pe brațul lung al cromosomului 5q. IL-5 este secretată de limfocitele T-CD4, de fapt de un tip dintre acestea — tipul 2, din cele două tipuri mai bine cunoscute (11a). Acest factor controlează și acțiunea citotoxică a eozinofilului (22a), care s-a dovedit capabil să omoare helminți, protozoare parazite și celule tumorale *in vitro*. Un efect sinergic cu IL-5 au, de asemenea, IL-3 și FSC-GM (35a). IL-5 și IL-3 stimulează progenitorii eozinofilici și supraviețuirea eozinofilelor sanguine. IL-3 și FSC-GM controlează în plus creșterea producției de leucotriene și citotoxicitatea dependentă de anticorpi. IL-5 exercită în plus o activitate chemotactică pentru eozinofile și stimulează atât citotoxicitatea mediată anticorpic și celular cât și degranularea eozinofilelor indusă de Ig.

Numărul absolut al eozinofilelor din sânge este 100—400/µl. Factorul eliberator al eozinofilelor controlează pătrunderea acestora în sânge. În circulație se găsește doar 1% din totalul eozinofilelor organismului. Timpul de tranzit al întregului proces de generare a eozinofilelor este de 11 zile, dintre care 2,5 zile aparțin compartimentului postmitotic. Eliberate în sânge din rezervele medulare, eozinofilele circulă 3—8 ore, după care prin diapedeză migrează în țesuturi unde au o durată de viață de până la câteva săptămâni. Sediile preferate sunt organele ce posedă o interfață epitelială în contact cu mediul ambiant: pielea, plămânul și tractul gastrointestinal. Recrutarea și migrarea eozinofilelor către un focar inflamator (alergic sau nu) se face sub influența unor agenți chemotactici, dintre care cei mai activi sunt PAF și C5a și în mai mică măsură IL-5, IL-3, IL-8, LtB4 ș.a. Eozinofilele pot fi găsite în canalul limfatic și în ganglioni.

FUNCȚIILE GRANULOCITELOR EOZINOFILE

Eozinofilul este o celulă fagocitantă, echipată enzimatic și energetic în acest sens, dar fagocitoza la eozinofil prezintă câteva particularități. Factorii cei mai activi chimiotaxic pentru eozinofil sunt complexele antigen-anticorp. Acțiune chimiotaxică au, de asemenea, fibrina și enzimele proteolitice, precum și histamina, căreia eozinofilul îi limitează efectul inflamator. Ca și neutrofilul, eozinofilul reacționează la stimularea chimiotaxică produsă de C5,6,7. Selectiv chimiotaxic pentru eozinofil acționează IgG_1, în cursul reacției anafilactice.

Fagocitoza la eozinofile urmează aceeași secvență a etapelor ca și la neutrofile, cu formarea fagosomului, apariția degranulării și activarea metabolismului celular. Activitatea secretoare și ingestia activă a complexelor imune duc la concluzia că eozinofilul are un rol important în reacțiile imune, de limitare a leziunilor produse de complexele imune. Aceste acțiuni sunt mediate de o amino-oxidază care neutralizează his-

tamina și alte substanțe, cum sunt 5-hidroxitriptamina și bradikinina. În plus, eozinofilul elaborează un inhibitor, probabil prostaglandinic, care inhibă degranularea mastocitelor. În anumite condiții, eozinofilul eliberează substanțe care, acționând ca mediatori, cum sunt LTC_4, PAF, 15-HETE, proteina bazică majoră, iau parte activă în procese inflamatoare imunoalergice (rinită alergică, astm bronșic). În astmul bronșic se atribuie eozinofilului în ultimul timp un rol important, fiind considerat de unii ca cea mai proeminentă celulă inflamatoare (26a).

PAF produs de eozinofilul stimulat are efecte autocrine marcate. El stimulează primirea de O_2 de către eozinofil, eliberarea de superoxid, crește nivelul de Ca^{++} intracelular, precum și afinitatea de fixare a componentei IC3b a complementului. Celulele endoteliale vasculare sunt probabil unul din principalii producători de PAF pentru a activa eozinofilul.

Pe lângă complexele antigen-anticorp sau complexele de factor reumatoid, eozinofilele ingerează bacterii și fungi, dar sunt mai puțin avide față de ele decât neutrofilele. În mod paradoxal, cu toate că eozinofilele produc mai mult peroxid decât neutrofilele, ele au o activitate bactericidă și citotoxică mai redusă. Pentru distrugerea unor paraziți *(Schistosoma mansoni)* care nu pot fi fagocitați, eozinofilul se atașează de aceștia prin receptori Fc, iar prin degranulare la exterior, eliberează „proteina bazică majoră" cu rol distructiv (acțiune citotoxică). Unele observații recente sugerează că eozinofilul și IL-5 pot juca un rol pozitiv în imunitatea tumorală.

PATOLOGIA GRANULOCITELOR EOZINOFILE

Eozinofilia constă în creșterea numărului de eozinofile peste 700/µl (sau $0{,}4 \times 10^9$/l). Cauzele eozinofiliei sunt multiple (tabelul 7.IV).

Creșterea eozinofilelor în sânge evoluează paralel cu o eozinofilie în măduvă osoasă, care poate fi prezentă uneori și fără eozinofilia sanguină. Eozinofilia poate fi uneori masivă (hipereozinofilie, stare leucemoidă eozinofilică), traducând de obicei o hiperreactivitate alergică, mai ales în cursul unor verminoze (trichinoză, strongiloidoză).

Granulomul eozinofilic este o boală benignă, întâlnită mai mult la copii și adulți tineri, caracterizată prin infiltrate granulomatoase unisau multifocale, constituite din agregate de eozinofile și celule mononucleare, localizate mai frecvent în oase.

Descoperirea cauzei unei eozinofilii este uneori dificilă. Pentru aceasta sunt necesare investigații clinice, anchete profesionale și familiale, examene de laborator pentru paraziți, alergologice, radiologice și pentru boli infecțioase. Cu toate acestea, în unele cazuri identificarea cauzei nu poate fi făcută decât prin examene repetate și prin urmărirea evoluției. Trebuie avut în vedere că cele mai frecvente cauze sunt cele alergice, parazitare și dermatologice.

Sindromul hipereozinofilic primar este denumirea care se dă unei eozinofilii cu valori înalte și de etiologie neprecizată, adesea asociată cu disfuncția unor organe, consecutivă infiltrării cu eozinofile și efectelor

toxice ale produselor lor. Eozinofilia depășește 1 500/µl, persistă peste 6 luni, infiltrează țesuturile și organele, ducând la disfuncția acestora. Deoarece există eozinofilii secundare cu număr mare de celule, numai după eliminarea acestora prin examene foarte minuțioase se poate lua

TABELUL 7.IV

Cauzele eozinofiliei

1) *Boli alergice:* astm bronșic, urticarie, dermatită atopică, rinită alergică, edem angioneurotic, boala serului, vasculite alergice, reacții de hipersensibilitate (inclusiv cele la medicamente).

2) *Boli parazitare:* îndeosebi cele cu invadarea țesuturilor — trichinoza, echinococoza; mai puțin parazitozele intestinale — nematode, trematode, cestode; infecții cu protozoare ca *pneumocystis,* toxoplasmoza, amebiaza, giardiaza, malaria.

3) *Boli de piele:* pemfigus, dermatita herpetiformă, psoriazis, eczemă, eritem multiform, prurigo, ihtioză, *mycosis fungoides,* scabia etc.

4) *Boli de sânge:* leucemia granulocitară cronică, policitemia vera, boala Hodgkin, leucemia cu eozinofile, limfocitoza infecțioasă acută, după splenectomie, sindromul hipereozinofilic primar, limfadenopatia angioimunoblastică.

5) *Tumori* de orice tip și cu orice localizare, îndeosebi cele metastazate sau necrozate.

6) *Imunodeficiențe:* sindromul Wiskott-Aldrich, sindromul Nezelof cu displazie timică și hiper-IgE, sindromul hiper-IgE, reacții grefă contra gazdă.

7) *Boli diverse:* infiltratul pulmonar cu eozinofile, sindromul Löffler, aspergiloza bronhopulmonară, gastroenterita eozinofilică, colița ulceroasă, poliarterita nodoasă, artrita reumatoidă, dermatomiozita, fasciita eozinofilică, sindromul Churg-Strauss, sarcoidoza, boli renale cronice, hipoadenocorticismul, sindromul Dressler, uneori în cursul dializei peritoneale, uneori boala Addison.

8) *După iradiere.*

9) *Eozinofilia* ereditară (familială).

în considerare sindromul hipereozinofilic primar. Diferențierea este necesară pentru că eozinofiliile secundare însoțesc afecțiuni deseori grave, dar care pot fi tratate cu succes.

Sindromul hipereozinofilic primar se întâlnește la pacienți de sex masculin, în vârstă de 20—50 de ani și are o mortalitate de 50% la un an. Simptomele obișnuite sunt oboseala, indispoziția și mialgiile. Dintre semne sunt de reținut: febra, tusea, dispneea, pruritul, eritemul cutanat. Mai importante sunt leziunile diverselor organe, îndeosebi ale aparatului cardiovascular, prezente la 80% din pacienți și reprezintă principala cauză de moarte. Leziunile pot consta în necroză a peretelui ventricular sau infarct de miocard prin afectarea endoteliului coronarelor cu formarea de tromboze. Fibroza miocardică și a valvelor mitrală și tricuspidiană, cu retracția acestora, duce la regurgitare sanguină și insuficiență cardiacă. Complicațiile pulmonare sunt reprezentate de revărsate lichidiene pleurale, dar și de infiltrate interstițiale difuze. Semnele neurologice pot consta în confuzie, psihoze, ataxie, disartrie, hemipareze sau neuropatii periferice. Hepatomegalia este frecventă, dar de cele mai multe ori este urmare a insuficienței cardiace. Pruritul și leziuni de tip urticarian sunt uneori prezente. Anemia este prezentă de

obicei, datorată îndeosebi infiltrării intense a măduvei osoase cu eozinofile în diverse stadii de maturație.

Aceste simptome și semne nu pot diferenția o leucemie cu eozinofile de o altă manifestare hipereozinofilică, nici chiar numărul de leucocite, care poate ajunge la 100 000/µl cu 50—80% eozinofile. Logica ne obligă să admitem existența leucemiei cu eozinofile, dar nu avem date sigure în acest sens. Poate biologia moleculară va reuși individualizarea acestei leucemii. Până atunci, termenul de sindrom hipereozinofilic primar este mai mult folosit. Uneori se poate dovedi că eozinofilia ține de o leucemie acută mielomonocitară, prin punerea în evidență a unei deleții sau inversii ale cromosomului 16 — inv. (16) (p13; q22) sau t(16; 16)(p13; q22) — (vezi capitolul Leucemii acute). În plus, eozinofilele pot fi mari, cu granulații bazofile și reacții biochimice atipice. Într-un sindrom hipereozinofilic a fost dovedită proliferarea clonală a limfocitelor T-CD4+, tip 2, care produc IL-4 și IL-5, iar alte studii au sugerat că limfocitele T sunt implicate în inducția sindromului prin produsele lor: IL-5, factor de diferențiere și activare a eozinofilelor și IL-4 care stimulează producția de IgE (11a).

În cazurile asimptomatice sau oligosimptomatice este de preferat abținerea de la tratament. Când eozinofilia depășește 5 000 de elemente/µl, administrarea de antihistaminice și glucocorticoizi este justificată. Administrarea de interferon alfa (5 milioane U.I./zi) s-a dovedit eficace (11a). Agravarea complicațiilor face necesară chimioterapia, îndeosebi cu hidroxiuree. Dacă este plauzibil diagnosticul de leucemie cu eozinofilie, chimioterapia trebuia să fie de tipul celui din leucemia acută mieloblastică. Excluderea mieloproliferării acute justifică tratamentul imunosupresor cu ciclosporină A, ciclofosfamidă, corticoizi. Complicațiile tromboembolice sunt tratate cu anticoagulante. Când complicațiile majore sunt sub control, disfuncțiile valvulare pot fi corectate chirurgical.

Eozinopenia. Importanța clinică a unui număr scăzut de eozinofile este redusă. Eozinopenia apare în stările de hiperactivitate adrenocorticosteroidă din cursul traumatismelor, intervențiilor operatorii, sindroamelor infecțioase, expunerii la frig, eforturilor fizice mari și după administrare de corticosteroizi. În toate aceste cazuri, eozinopenia este însoțită de neutrofilie (4). Mecanismul de producere al eozinopeniei este puțin cunoscut; acesta ar putea fi scăderea mobilizării rezervelor medulare.

SERIA GRANULOCITARĂ BAZOFILĂ

MORFOLOGIA GRANULOCITELOR BAZOFILE

Celulele acestei serii provin dintr-un precursor capabil să producă *in vitro* colonii omogene de bazofile în diverse stadii de maturație. Această celulă formatoare de colonii bazofile (CFC-Ba) este ultima din șirul de celule precursoare care s-a diferențiat ireversibil din celula stem pluripotentă pentru producerea de granulocite bazofile. Diferențierea bazofilelor și mastocitelor din celula lor precursoare este indusă de o

citokină produsă de celulele endoteliale și celulele stromale (fibroblaști), denumită factorul de creștere al mastocitelor sau kit ligand (KL). Ca și în cazul eozinofilelor, primele celule din seria bazofilă, *mieloblastul* și *promielocitul,* nu au caractere distinctive față de omologul lor din seria neutrofilă. Numai mielocitul poate fi identificat ca bazofil, deoarece în acest stadiu de maturație se sintetizează granulațiile specifice bazofile.

Granulațiile bazofile sunt de dimensiuni și forme variabile, colorate în albastru-violet (colorație metacromatică). Ca și celelalte granulații specifice, cele bazofile apar în număr mic încă din stadiul de promielocit; la celulele mai evoluate ele acoperă și fac aproape invizibil nucleul. Deoarece sunt solubile în apă, pot fi îndepărtate în cursul colorației; în locul lor rămân spații goale, rotunde, colorate slab în roșu. Granulațiile bazofile conțin cantități mari de heparină și histamină, care dau afinitatea pentru coloranți bazici. La microscopul electronic s-a demonstrat că granulațiile bazofile, ca și cele eozinofile, iau naștere din cisternele aparatului Golgi.

Mielocitele bazofile se deosebesc de cele neutrofile prin granulații, dimensiunile mari ale mitocondriilor și reticulul endoplasmic bine reprezentat. Bazofilele nu conțin decât un tip de granulații, cele specifice. Citoplasma bazofilului matur conține particule de glicogen, mitocondrii, ribosomi liberi, detectabili ultrastructural.

Segmentul bazofil conține câteva sute de granulații specifice metacromatice, mari, dispuse și peste nucleul segmentat. Mitocondriile sunt mari și numeroase.

Mastocitele din țesuturi, foarte asemănătoare cu bazofilele din sânge, sunt doar mai mari, cu nucleul nesegmentat și granulații mai mici, numeroase. În plămâni și piele sunt în concentrații de $1—10\times10^6$ celule/g țesut.

Bazofilul și mastocitul posedă în granulații un echipament bogat și variat de mediatori vasoactivi, bronhoconstrictori și chimioplastici, cum sunt: histamină, produse de oxidare ale acidului arahidonic (prostaglandine și leucotriene), factori chimiotactici pentru eozinofile și neutrofile, enzime active (chimază, kalikreină, arilsulfatază și beta-glucuronidază), precum și proteoglicani structurali (heparina). Unii din acești mediatori sunt preformați, iar alții sunt sintetizați ca urmare a acțiunii stimulului declanșator. Datorită acestor numeroși factori, din care unii sunt produși în celulă printr-un proces de degranulare, bazofilele și mastocitele joacă un rol în reacții inflamatoare și imunologice. Degranularea acestora poate fi produsă fie prin stimuli imuni (interacțiune cu IgE și stimulare prin anafilatoxină), fie prin stimuli neimuni: enzime, policationi, opiacee, substanțe de contrast radiologice, ACTH, vitamină A, dextran. Ambele tipuri de celule bazofile își descarcă conținutul în exteriorul celulei. Stimularea mastocitelor IgE-dependentă induce o degranulare relativ lentă (5—7 minute) care necesită prezența de Ca^{++} extracelular și care se traduce prin eliberarea de mediatori preformați (histamină, proteaze) și prin generarea de PGD_2 și de αTC_4 neosintetizate. Activarea mastocitelor prin neuropeptidaze, cum sunt substanța P sau somatostatina, declanșează o degranulare rapidă (circa 10 secunde) dar cu eliberare numai de mediatori preformați, favorizată de mobilizarea Ca^{++} intracelular.

Spre deosebire de bazofile care conțin proteina de bază majoră, sau lizofosfolipaza, mastocitele nu conțin aceste proteine. Deși mișcările bazofilului sunt mai încete decât ale celorlalte granulocite, el este capabil să migreze în țesuturi.

CICLUL DE VIAȚĂ

Ciclul de viață al bazofilului este puțin cunoscut. CFC-Ba este stimulată de IL-4, derivată din limfocitele T având gena pe cromosomul 5q. IL-4 acționează sinergic cu IL-3. Numărul bazofilelor în sânge este foarte mic, uneori absent.

Mastocitele sunt produse în măduvă și ajung în țesuturi traversând în cantități foarte mici prin sânge. Este posibil ca din măduvă să migreze progenitori mastocitari. Multiplicarea mastocitelor se realizează fie prin precursorii medulari ajunși în țesuturi, fie din mastocitele cu aspect matur.

Distribuție. Mastocitele sunt localizate mai frecvent în țesuturile cu interfață între mediul extern și cel intern: piele, căile aeriene, tractul gastrointestinal și la nivelul membranelor bazale epiteliale și endoteliale. Ca exemplu, în piele numărul lor a fost evaluat la $12{,}1 \pm 5{,}1 \times 10^6/mm^3$. În căile aeriene, unde mastocitele au un rol important în inflamația astmatică, ele sunt distribuite prevalent în submucoasă, dar se găsesc și între celulele epiteliale, sursa probabilă a mastocitelor ce se găsesc în lichidul de lavaj bronhoalveolar.

Bazofilele și mastocitele sunt înrudite prin multe trăsături morfologice, cea mai importantă fiind prezența granulațiilor bazofile, și citochimice, prezența de histamină și de receptori IgE de mare afinitate. Cu toate acestea, există și elemente de diferențiere între bazofile și mastocite. Mastocitul este celulă tisulară, nu circulă prin sânge, are o durată de viață mai lungă. *In vitro* au fost obținute colonii de mastocite, dovadă a existenței unei CFC-Ma, produsă în măduvă și migrată în țesuturi. Tabelul 7.V prezintă deosebirile dintre cele două populații celulare.

FUNCȚIILE GRANULOCITELOR BAZOFILE ȘI ALE MASTOCITELOR

Rolurile fiziologice ale bazofilului, ca și ale mastocitului, nu sunt complet cunoscute. Bazofilul este capabil de fagocitoză, dar la o scară redusă. Evenimentul cel mai important în cazul bazofilului și mastocitului îl constituie degranularea, care se produce în întreaga celulă, nu localizat, ca la granulocit. De procesul degranulării, prin care se pun în libertate numeroși mediatori (tabelul 7.VI) se leagă întreaga fiziologie și fiziopatologie a bazofilului și mai ales a mastocitului. Degranularea are o importanță practică în diagnosticul unor stări alergice.

Bazofilele și mastocitele au și receptori de membrană (FCERI) cu o afinitate mare față de porțiunea Ec a anticorpilor IgE. Fixarea pe

TABELUL 7.V

Caracteristicile bazofilelor și mastocitelor (după 17a)

Caracteristici	Bazofile	Mastocite
Originea precursorilor	Măduvă	Măduvă
Loc de maturare	Măduvă	Țesut conjunctiv
Celule mature în circulație	Da (în jur de $<1\%$ din leucocitele circulante)	Nu
Celule mature recrutate din circulație în țesuturi	Da (în cursul răspunsurilor imune, inflamatorii)	Nu
Celule mature rezidente normal în țesuturi conjunctive	Nu (nedetectabile microscopice)	Da
Capacitate proliferativă a celulelor morfologic mature	Neraportată	Da (în anumite condiții)
Durata de viață	Zile (ca și a altor granulocite)	Săptămâni până la luni (după studiile făcute pe rozătoare)
Mediatori		
Mediatori majori preformați și depozitați în granulele citoplasmice	Histamină, sulfați de condroitină, protează neutrală cu activitate generatoare de bradikinină, β-glucuronidază, elastază, proteină bazică majoră, enzimă Gcatepsină-*like*, proteină din cristali Charcot-Leyden	Histamină, sulfați de heparină sau condroitină, proteaze neutrale (triptază, cu sau fără chimază), hidrolaze acide, Gcatepsină, carboxipeptidază
Mediatori lipidici majori produși după o activare apropriată	Leucotriene C_4	Prostaglandină D_2, leucotriene C_4
		Factor activator plachetar (PAF)
Citoxine eliberate după o activare apropriată	IL-4 la șoarece?	TNF-α (la șoarece mai multe, ca: IL-1, 3, 4, 5 și 6, GM-CSF, IFN γ ș.a.)
Structuri de suprafață		
Receptori IgE	Fc ε RI, Fc γ RII (CDw32)	Fc ε RI (în număr de 100 000—500 000)
	Receptori pentru IL-2, 3, 4, 5 și 8 și SCF (unele bazofile exprimă puțini receptori c-kit)	receptori c-kit
Structuri de adeziune celulară	Lanț LFA1α (CD11a), receptor C43 bi (CD11b), gp 150/95 (CD11c), lanț LFA-1β (CD18), ICAM-1 (CD54) și CD44	ICAM-1 (CD54) și CD44

membrană a IgE declanșează degranularea anafilactică, cu eliberare masivă de mediatori vasoactivi și proinflamatori, ca histamina și derivații acidului arahidonic ce determină manifestări de hipersensibilitate imediată (astm bronșic, urticarie, rinită alergică, reacții la medicamente, înțepături de insecte) (14). Alți stimuli, ca anafilatoxinele (fragmente de

TABELUL 7.VI

Mediatori prezenți în mastocit
(modificat după 39)

Mediator	Funcții
1	2
1. *Mediatori activi pe vase și pe mușchiul neted*	
Histamina (preformată)	Contracția mușchiului neted Creșterea permeabilității vasculare Stimularea supresorului limfocitelor T Generarea de prostaglandine Intensificarea (H_1) sau inhibiția (H_2) chemotaxiei Creșterea cAMP (H_2) și a cGMP (H_1)
Leucotriene: LtC_4, LtB_4 (nou generate)	Contracția mușchiului neted Creșterea permeabilității vasculare sinergică cu histamină (LtC_4) Chemotaxie pentru neutrofile (LtB_4)
LtD_4, LtE_4	Generarea de prostaglandine Vasodilatație, bronhoconstricție
Serotonina	Contracția unor mușchi netezi Creșterea permeabilității vasculare
PAF (Factor de activare plachetară) (nou generat)	Eliberarea de amine plachetare (serotonina) Agregarea plachetară Sechestrarea plachetelor
Metaboliți ai acidului arahidonic: PGD_2, PGE, PGI $PGF_{2\ alfa}$	Contracția mușchiului neted (PGD_2, $PGF_{2\ alfa}$, TXA, PGG_2, PGH_2) Relaxarea mușchiului neted (PGE_2)
HETE (mediatori chemotactici lipidici)	Creșterea cAMP (PGE, PGD_2, PGI) Creșterea cGMP ($PG_{2\ alfa}$, PGG_2) Atracție chemotactică dependentă de doză a eozinofilelor sau neutrofilelor (HETE)
2. *Mediatori chemotactici*	
Factorul chemotactic eozinofil al anafilaxiei (preformat) (FCE-A)	Atracție chemotactică și de activare a eozinofilelor și neutrofilelor
Glucopeptide cu acțiune de tip FCE (preformate)	Atracție chemotactică și de activare a eozinofilelor și neutrofilelor
Factorul chemotactic neutrofil (FCN) preformat	Atracție chemotactică și de activare a neutrofilelor

(Continuarea tabelului 7.VI)

1	2
Histamina	Activare chemotactică și chemokinetică H_1 a eozinofilelor Inhibiție chemotactică și chemokinetică H_2 a neutrofilelor și eozinofilelor
3. *Mediatori de tip proteoglicani structurali*	
Heparină (preformată)	Anticoagulare, interacțiune cu antitrombina III Inhibiție a activării complementului Clarificarea plasmei de lipide
Condroitin sulfat 4 și 6 (preformat) Dermatan sulfat	Interacțiune cu factorul IV plachetar ?
4. *Mediatori enzime*	
Chimază (preformată)	Proteoliză cu specificitate chimotriptică
Triptază (tripsin-*like*) (preformată)	Activitate fibrinolitică
Arilsulfatază (preformată)	Hidroliza SRS-A și a diverși sulfat esteri
N-acetil-beta-D-glucosaminidază	Clivarea reziduurilor glucozaminici
Carboxipeptidază	Clivarea reziduurilor cu C terminal
Kalikreină pulmonară a anafilaxiei	Proteoliză cu specificitate triptică Clivarea kininei din kininogen Clivarea factorului Hageman
5. *Citokine*	
TNF-α (preformat)	Acumularea leucocitelor IgE-dependente în faza tardivă a răspunsului alergic. Activarea endoteliului vascular
IL-3	Factor stimulator de colonii
IL-5	IL-5, acțiune predominant eozinofilopoietică
6. *Oxidul de azot (NO)* (nou generat)	Vasodilatație

complement), proteine lizosomale din neutrofil, venin de insecte, soluții de contrast utilizate în radiologie, frigul, medicamente — narcotice și miorelaxante — pot, de asemenea, degranula bazofilele, fără intervenția IgE.

Mastocitul activat joacă un rol important în inflamație, prin numeroșii săi mediatori proinflamatori eliberați prin degranulare și care participă la componentele umorale și celulare ale inflamației (fig. VII.4). În inflamația bronșică astmatică, mastocitul pare să fie inițiatorul răspunsului indus de alergen și responsabilul pentru reacția alergică imediată. TNF-α eliberat din mastocite poate contribui în plămân și la reacția tardivă. Mastocitele sunt implicate și în alte diverse răspunsuri

biologice, ca în angiogeneză și vindecarea rănilor, remodelarea osoasă, boala ulceroasă, ateroscleroză și în unele procese inflamatorii ca: artrita reumatoidă, sclerodermie, fibroze pulmonare, colita ulceroasă, reacția grefă contra gazdă (17 a). Se discută și un rol al mastocitelor în apărarea antitumorală. Mastocitele de șoarece au capacitatea de a ucide unele celule tumorale, mediatorul responsabil de această acțiune fiind

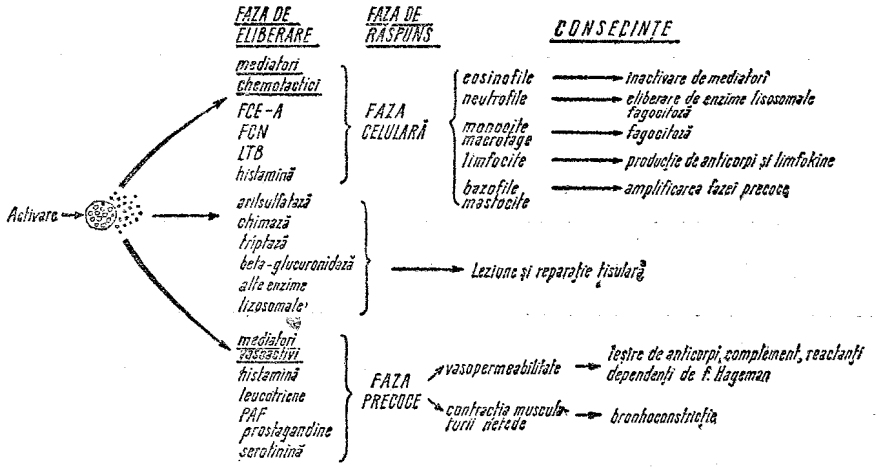


Fig. VII.4. — Schema participării mastocitului la componentele umorale și celulare ale inflamației [modificat după (39)].

serotonina. Pe lângă rolul lor de inițiatoare ale reacțiilor alergice acute prin eliberarea de mediatori rapid activi, cum sunt histamina și produse ale acidului arahidonic, mastocitele pot orchestra infiltrația de leucocite la nivelul activării mastocitelor, efect dependent în mare măsură de citokine și care durează câteva ore.

PATOLOGIA GRANULOCITELOR BAZOFILE

Bazofilia. Prin bazofilie se înțelege creșterea numărului de bazofile din sânge peste 150/μl. Bazofilia însoțește de obicei nivelurile crescute de IgE, în cursul reacțiilor inflamatorii din colite ulcerative, artrite reumatoide, urticarie, dar apare și după splenectomie sau în mixedem.

Bazofilia poate fi prezentă în leucemiile cronice și acute. În leucemiile cronice granulocitare există cazuri asociate cu bazofilie, uneori considerabil de mare, în cursul fazei cronice. Tendința la creștere a bazofiliei anunță, de obicei, evoluția accelerată a bolii sau transformarea acută a acesteia. În leucemiile acute mieloblastice se cunoaște o formă cu t(6;9), t(3;6) sau inv(16) și cu bazofilie medulară. De asemenea, există o formă de leucemie acută promielocitară asociată cu maturație bazofilă. Tot atât de rară și de dificil de diagnosticat, ca și leucemia acută cu eozinofile, este leucemia acută cu bazofile. Diferențierea tuturor acestor posibilități de implicare a bazofilelor într-un proces leucemic se face foarte greu prin mijloacele cunoscute. Poate tehnicile de biologie moleculară în curs de elaborare să ofere noi căi în acest domeniu.

Scăderea numărului de bazofile nu are nici o semnificație diagnostică. Ea se observă în stările de stres, infecții acute, hipertiroidii, administrare de corticosteroizi.

Mastocitozele reactive apar ca urmare a unor reacții de hipersensibilitate imediată sau întârziată. Răspunsul local, tisular, este indus de anafilatoxine, IgE și limfokine. Sub influența acestora se eliberează mediatorii stocați în granulocite (histamina, heparina, factori chemotactici, proteaze, glicozidaze) sau factori nou formați, cum sunt metaboliții acidului arahidonic derivați prin acțiunea ciclooxigenazei (prostaglandina D) sau a lipogenazei (leucotrienele C4, D4 și E4). În afecțiuni cu astmul, rinita alergică sau urticaria, aceste substanțe produc vasodilatație, hipotensiune, tahicardie, șoc.

Mastocitozele propriu-zise sunt boli primare, idiopatice, caracterizate printr-o proliferare excesivă a mastocitelor în diverse organe. În raport cu localizarea, manifestările și asocierile lor, au fost descrise mai multe forme:

- *Mastocitoza pielii* sau *urticaria pigmentosa* cu câteva subforme:
  — micronodulară la copilul mic (tip Unna);
  — xantelasmoidă (mastocitoxantoame) la copil;
  — vasculitică, la adult (tip Rona-Judasohn).
- *Mastocitomul primar,* cu aspecte variind de la tumori benigne nodulare, circumscrise, solitare ale pielii, până la tumori maligne multifocale, infiltrative.
- *Mastocitoze sistemice* cu afectări gastrointestinale (gastrite, ulcere peptice, hemoragii digestive, sindrom de malabsorbție), hepatosplenomegalice (fibroză hepatică, ascită), ale măduvei osoase, ale ganglionilor (limfadenopatii), ale oaselor.
- *Mastocitoze asociate* cu tulburări hematologice: mieloproliferative, mielodisplazice, leucemie acută nelimfocitară, limfoame maligne, neutropenie cronică.
- *Mastocitoze agresive.*
- *Leucemia cu mastocite.*

Dintre bolile primare ale mastocitelor sunt de reținut urticaria pigmentosa și mastocitoza sistemică.

Urticaria pigmentosa este o acumulare localizată, intradermică, de mase de mastocite. Manifestările cutanate cu distribuție simetrică pot avea aspect de macule brun-roșiatice, de papule sau noduli. Pruritul intens și semnul Darier pozitiv (urticaria ce apare după o fricțiune ușoară a pielii) sunt frecvente. Pruritul este intensificat de schimbări de temperatură, băuturi fierbinți, alcool, condimente. Diagnosticul se pune prin prezența infiltratelor cu mastocite pe biopsii din leziunile cutanate. Boala este mai frecventă la copil și dispare în circa 50% din cazuri după pubertate.

Mastocitoza sistemică este o afecțiune rară, întâlnită mai mult la adult. În unele cazuri, *urticaria pigmentosa* a copilului poate evolua spre mastocitoza sistemică a adultului. Manifestările principale se datoresc excesului de histamină care produce eritem, cefalee, amețeală, palpitații, dispnee, dureri toracice, crampe abdominale, greață, hipotensiune, sincope și șoc. Unele simptome sunt exacerbate de stres sau de

unele medicamente. Semnele cutanate sunt variabile, ca macule și papule hiperpigmentate, noduli, prurit cu dermografism. Infiltrarea cu mastocite poate duce la adenopatii, hepatomegalie, splenomegalie, fibroză hepatică, hipertensiune portală, ascită, dureri abdominale, gastrite, ulcere, hemoragii digestive, malabsorbție digestivă. Simptomele respiratorii apar în jur de 30% din cazuri și sincopele în 25%. Uneori apar și anomalii osoase, ca: osteoporoză, osteoscleroză, leziuni osteolitice. În sânge poate apărea pancitopenia și în biopsia de măduvă osoasă sunt prezente mastocite. Examenul radiologic poate pune în evidență edeme ale mucoasei digestive, ulcere, polipi. Diagnosticul este pus de acumularea de mastocite în piele, ficat sau ganglioni cu manifestările clinice respective, de examenul radiologic și biochimic și frotiul medular. Histamina sau acidul 1-metil-4-imidazolacetic, metabolitul major al histaminei, precum și metaboliți ai prostaglandinei D_2 pot fi detectați în cantități crescute în urină, dar nu au specificitate diagnostică. Uneori este necesar să se determine în urină acidul 5-hidroxiindolacetic și metaboliți catecolaminici (metanefrine) pentru a elimina un carcinoid sau un feocromocitom.

Evoluția este dependentă de forma de boală: ușoară, medie sau severă, în funcție de extindere și organele afectate. În decadele a șasea și a șaptea de viață se poate dezvolta forma malignă de mastocitoză sistemică, în care supraviețuirea este mai mică de 2 ani. În unele cazuri a fost semnalată evoluția spre leucemia acută mieloblastică, leucemia acută cu mastocite sau limfom.

Tratamentul mastocitozelor se adresează în primul rând excesului de histamină, care poate fi redus prin antagoniști ai receptorilor H_2 (ranitidină, cimetidină), care scad hiperaciditatea gastrică, și antagoniști ai receptorilor H_1 (clorfeniramina). Util este și doxepinul, 10—20 mg, de 2 ori pe zi sau hidroxizinul, care scad pruritul și tahicardia. Se evită stimulatorii mastocitelor, ca alcoolul, aspirina și alte medicamente antiinflamatorii nesteroide, anticolinergicele. Foarte util este ketotifenul, antihistaminic H_1 intens, anticolinergic și antiserotoninic, care inhibă degranularea mastocitelor, ca și cromoglicatul disodic. Corticosteroizii pot aduce ameliorări ale manifestărilor cutanate în aplicări locale, sau pe cale sistemică în formele severe de malabsorbție. Bolnavul trebuie să fie informat despre posibilitatea unui șoc anafilactic și instruit în consecință.

BIBLIOGRAFIE

1. APĂTEANU V., DRAGOMIRESCU T., GRIGORIU G.: Granulocitul neutrofil. Edit. Medicală, București, 1983.
1a. AHUJA K. S. și colab.: Immunol. To Day 1994; 15: 281.
2. ATHENS J. W.: Regulation of haematopoiesis. Edit. Appleton, New York, 1970.
3. BAINTON D. F.: Brit. J. Haematol. 1975; 39: 17.
4. BASS D. A.: J. Clin. Invest. 1980; 65: 1266.
5. BESSIS M.: Cellules du sang normal et pathologique. Edit. Masson, Paris, 1972.
6. BOGGS D. R. și colab.: Am. J. Physiol. 1966; 211: 51.
7. BOXER L. A., STOSSEL T. P.: În: Williams W., Beutler E., Erslev A. J., Lichtman M. A. (eds.): Haematology. McGraw-Hill Book Comp., New York, 1983.

8. BROWN C. C., GALLIN J. I.: Hematol./Oncol. Clin. 1988; 2: 61.
9. BROXMEYER H. E. și colab.: J. Exp. Med. 1978; 148: 1052.
10. CANNISTRA S. A., GRIFFIN J. D.: Semin. Hematol. 1988; 25: 173.
11. CLINE M. J.: J. Lab. Clin. Med. 1973; 81: 311.
11a. COGAN E. și colab.: New Engl. J. Med. 1994; 330: 535.
12. CRONKITE E. P., VINCENT P. C.: Haemopoietic cellular proliferation. Edit. Grune-Stratton, New York, 1970.
13. DENBURG J. A., DAVISON M., BIEMENSTOCK J.: J. Clin. Invest. 1980; 65: 390.
14. DVORAK A. M. și colab.: Lab. Invest. 1980; 43: 126.
15. FALLOON J., GALLIN J. J.: J. Allergy Clin. Immunol. 1986; 77: 653.
16. FIRKIN F. C.: Aust. N. Z. J. Med. 1985; 15: 93.
17. FOREHAND J. R., JOHNSTON R. B.: Clin. Immunol. Allergy 1985; 5: 351.
17a. GALLI J. S.: N. Engl. J. Med. 1993; 328: 257.
18. GOLDE D. W.: În: WILLIAMS W. J., BEUTLER E., ERSLEV A. J., LICHTMAN M. A. (eds.): Hematology. McGraw-Hill Book Comp., New York, 1983.
19. GREENE B. M., COOLEY D. G.: J. Immunol. 1974; 113: 910.
20. GRIFFIN J. D. și colab.: J. Immunol. 1984; 133: 1863.
20a. HARLAN J. M.: Clin. Immunol. Immunopathol. 1993; 67: S16—S24.
21. HEYMAN M. R., WALSH T. J.: Cancer 1987; 59: 1903.
22. KLEBANOFF S. J., PINCUS S. H.: J. Clin. Invest. 1971; 50: 2226.
22a. KUBIN R.: Dtsch. Med. Wschr. 1992; 117: 307.
23. KURLAND J., MOORE M. A. S.: Exp. Hematol. 1977; 5: 357.
24. KURLAND J. J. și colab.: Blood 1978; 52: 388.
25. LORD B. J.: Boll Ist. Sieroter, Milan 1975; 54: 187.
26. MALECH H. L., GALLIN J. I.: N. Engl. J. Med. 1987; 317: 687.
26a. MASAMICHI KOIKE, KIYOSHI TAKATSU: Arch. Allergy Immunol. 1994; 45: 62.
27. MASON M. J., VAN EPPS D. E.: J. Leukocyte Biol. 1989; 45: 62.
28. MAUNDER R. J. și colab.: Am. Rev. Resp. Dis. 1986; 133: 313.
29. MAZZONE A. și colab.: Oncology 1986; 43: 176.
30. METCALF D.: Hemopoietic colonies. Edit. Springer, Berlin, 1977.
31. MILLER A. M., McGARRY M. P.: Blood 1976; 48: 293.
32. MOORE M. A. S.: Clin. Hematol. 1979; 8: 287.
33. MORSTYN G. și colab.: Lancet 1988; 1: 667.
34. NANSEEF W. M.: Hematol/Oncol. Clin. 1988; 2: 135.
35. OLINESCU A.: Elemente de imunologie comparată. Edit. Ceres, București, 1988.
35a. PAUL C. C. și colab.: Blood 1993; 81: 1193.
36. ROBINSON W. A., MANGALIK A.: Semin. Haematol. 1975; 12: 7.
37. RYTÖMAA T., KIVINIENI L.: Cell Tissue Kinet. 1968; 1: 129.
38. THOMPSON R. A.: Immunol. Invest. 1988; 17: 85.
39. WASSERMAN S. I.: În: Pepys J., Edwards A. M. (eds.): The mast cell. Edit. Pitman, Philadelphia, 1982.
40. ZUCALI J. R. și colab.: J. Clin. Invest. 1986; 77: 1857.
41. ZUCKER FRANKLIN D.: Semin. Hematol. 1968; 5: 109.

VIII

SERIA MONOCITO-MACROFAGICĂ

Sinonime: sistemul macrofagic, sistemul reticuloendotelial (SRE), sistemul reticulohistiocitar (SRH), sistemul fagocitelor mononucleare.

S. NICOARĂ

Definiție, delimitare, istoric. Seria monocito-macrofagică este o familie de celule înalt specializate pentru apărarea organismului. Din această familie de celule fac parte: monoblaștii și promonocitele din măduvă, monocitele din sânge și diversele tipuri de macrofage (histiocite) din țesuturi (planșa a III-a).

Conceptul unei linii celulare continue: promonocite → monocite → macrofage și delimitarea de celelalte celule cu capacitate fagocitară sunt rezultatul unor cercetări, care au durat peste 3/4 de secol (1892—1969).

În 1892, Metchnikoff a făcut prima clasificare a celulelor cu capacitate fagocitară în fagocite polinucleare (microfage) și fagocite mononucleare (macrofage). El a scos în evidență strânsa corelația dintre macrofagele din splină, ganglioni limfatici, măduva osoasă și cele din țesutul conjunctiv și a recunoscut faptul că ele formează un sistem celular, pe care l-a numit *sistem macrofagic*.

În 1924, Aschoff a clasificat fagocitele mononucleare pe baza activității fagocitare, mai precis a coloidopexiei, și a emis conceptul de *sistem reticuloendotelial (SRE)*. Celulele reticulare, celulele reticuloendoteliale și celulele Kupffer au fost incluse în cadrul restrâns al SRE, iar histiocitele, splenocitele și monocitele în cadrul mai larg al SRE. Celulele endoteliale și fibrocitele au fost excluse din acest sistem, întrucât au activitate fagocitară slabă (tabelul 8.I).

Pentru perioada istorică respectivă, concepția lui Aschoff a reprezentat un progres. Au fost grupate într-un sistem unic celule cu morfologie și topografie extrem de variate, dar care aveau comun o proprietate fiziologică, și anume fagocitoza (coloidopexia). Termenul de SRE a fost larg acceptat și folosit de citologi și clinicieni. Conceptul

TABELUL 8.I

Două concepte celulare: sistemul reticuloendotelial și sistemul fagocitelor mononucleare

A. *Sistemul reticuloendotelial* (SRE) (Aschoff, 1924)

Creșterea activității fagocitare

- Celule endoteliale
- Fibrocite
- Celule reticulare ale splinei și ganglionilor limfatici
- Celule reticuloendoteliale ale sinusurilor limfatice și sanguine, inclusiv celule Kupffer
- Histiocite
- Splenocite și monocite

SRE în sens strict

SRE în sens larg

Criterii de clasificare: fagocitoză (coloidopexie). Markeri celulari: coloranți vitali și particule de cărbune (markeri instabili și nespecifici)

B. *Sistemul fagocitelor mononucleare* (SFM) (van Furth și Langevoort, 1969)

- Celule precursoare — măduvă osoasă
- ↓
- Promonocite — măduvă osoasă
- ↓
- Monocite — măduvă osoasă; sânge
- ↓
- Macrofage:
  - țesut conjunctiv (histiocite)
  - ficat (celule Kupffer)
  - plămâni (macrofage alveolare)
  - splină (macrofage libere și fixe)
  - ganglioni limfatici (macrofage libere și fixe)
  - măduvă osoasă (macrofage)
  - cavități seroase (macrofage pleurale și peritoneale)
  - țesut osos (osteoclaste)
  - sistem nervos (celule microgliale)
  - piele (celule Langerhans)

Criterii de clasificare: ciclul de viață, structura și funcția. Markeri celulari: izotopi radioactivi ($TdRH^3$), cromosomi și antigene tisulare (markeri stabili și specifici)

de SRE a dominat fiziopatologia hematologică timp de aproape jumătate de secol (1924—1969). O sinteză a cercetărilor din acest domeniu a fost prezentată în (1).

În 1926, Lewis și Lewis au demonstrat că, în culturi, monocitele se transformă în macrofage, în celule gigante multinucleate și în celule epitelioide. În 1932, Maximov a confirmat și extins aceste observații.

În 1939, Ebert și Florey au observat *in vivo* că monocitele, marcate cu particule de cărbune sau cu coloranți vitali, migrează din vasele sanguine în țesutul conjunctiv și se transformă în macrofage tisulare (histiocite) sau celule gigante.

În 1949, Thomas a propus schimbarea denumirii de SRE în aceea de *sistem reticulohistiocitar (SRH),* bazat pe ideea că histiocitele și nu celulele endoteliale sunt celulele reprezentative pentru acest sistem celular. Studii experimentale ulterioare au arătat că substanțele (coloranții vitali și particulele de cărbune) folosite pentru delimitarea SRH erau markeri celulari instabili și nespecifici.

După 1960, fagocitele mononucleare au fost studiate cu markeri celulari stabili și specifici (izotopi radioactivi, cromosomi și antigene tisulare). S-au obținut date noi privind ciclul de viață al acestor celule. Astfel, în 1965, Wolkman și Gowans (34), prin studii autoradiografice, au identificat măduva osoasă ca locul de origine al monocitelor din sânge. În 1968, van Furth și Cohn (10), prin studii similare, au demonstrat că macrofagele tisulare derivă din monocitele circulante. În preajma anului 1969 era evident faptul că nici conceptul de SRE și nici acela de SRH nu mai ofereau un cadru corespunzător pentru aceste celule.

În 1969, van Furth și Langevoort (11), în fruntea unui grup de experți OMS, au propus o nouă clasificare sub denumirea de *sistem al fagocitelor mononucleare.* Noua grupare s-a bazat pe următoarele criterii: ciclul de viață (originea, cinetica, distrugerea), structura și funcția. În acest sistem celular au fost încadrate: promonocitele și precursorii lor din măduvă, monocitele din sânge și diversele tipuri de macrofage din țesuturi. Din acest sistem au fost excluse: celulele reticulare, celulele endoteliale și fibroblaștii (fibrocitele). În contrast cu monocitele și macrofagele care au originea în măduvă, celulele endoteliale au origine endodermică, iar fibroblaștii una mezenchimală. Celulele reticulare sunt o subclasă de fibroblaști care sintetizează reticulină.

Deși conceptul de sistem al fagocitelor mononucleare a fost acceptat de un număr mare de citologi, totuși, ulterior, termenul tradițional de SRE/SRH a continuat să fie folosit de unii autori pentru fagocitele mononucleare (33).

În ultimii ani a devenit evident faptul că termenul de *macrofag* este sinonim cu cel de *histiocit.* Primul este preferat la descrierea biologiei și anatomiei acestor celule, cel de-al doilea pentru descrierea leziunilor histopatologice. Bolile care au la bază proliferarea histiocitelor au fost numite *histiocitoze* (25).

MORFOLOGIE

Structura fagocitelor mononucleare a fost studiată la microscopia optică, microscopia în contrast de fază, microscopia electronică în scanning și microscopia electronică de transmisie (8). Pe lângă colorațiile panoptice au fost folosite diverse teste citochimice. Cu anticorpi monoclonali specifici au fost determinate antigenele de suprafață (receptorii).

Monoblaştii nu pot fi diferenţiaţi în măduvă de mieloblaşti la microscopul optic, dar pot fi identificaţi în măduvă la bolnavii cu leucemie monocitară.

Promonocitele sunt foarte rare pe frotiurile de măduvă. Diametrul lor variază între 10 şi 20 μ. Nucleul este mare, rotund sau ovalar, uneori incizat şi prezintă nucleoli. Nucleul are capacitate de sinteză de ADN şi, deci, de mitoză. Citoplasma este intens bazofilă şi nu are granulaţii azurofile. La microscopul electronic, în citoplasmă se pot observa multe agregate de ribosomi şi aparat Golgi bine dezvoltat (fig. VIII.1). Marginile celulare sunt ondulante şi cu microvili. Aceste celule au capacitatea de fagocitoză. Citochimic, în citoplasmă se găsesc esteraze nespecifice, iar la nivelul aparatului secretor celular peroxidaze, fosfatază acidă şi arilsulfatază. Reacţiile citochimice permit identificarea promonocitelor pe frotiurile de măduvă.

Monocitele se găsesc în sânge, în ţesuturi şi în cavităţile organismului.

La microscopul optic, pe frotiurile de sânge colorate cu metoda panoptică aceste celule au un diametru între 10 şi 15 μ, fiind cele mai mari celule sanguine (fig. VIII.2). Nucleul ocupă aproximativ jumătate din suprafaţa celulară şi uzual este plasat excentric. Forma nucleului este frecvent reniformă, cu incizură, rar este rotundă sau neregulată. Structura cromatiniană este caracteristică, şi anume fină, „pieptănată". Nucleul nu are nucleoli, iar capacitatea de sinteză a ADN este redusă. Citoplasma este etalată, se colorează cu coloranţi panoptici în gri-albastru („fumuriu") şi conţine fine granulaţii azurofile. Aceste granulaţii sunt dispersate omogen şi pot da întregii citoplasme o nuanţă rozată. Citoplasma prezintă frecvent vacuole şi un număr variabil de granulaţii azurofile mari. Rareori, pe frotiul de sânge se găsesc monocite care fagocitează (fig. VIII.3).

La microscopul cu contrast de fază se pot observa monocite vii, tendinţa de aderenţă şi etalare pe suprafaţa de sticlă şi modificările structurale în cursul tranziţiei de la monocite la macrofage.

La microscopul cu contrast de fază nucleul apare reniform, palid, cu cromatina fină, reticulată şi cu o incizură profundă (fig. VIII.4). Nucleul prezintă o depresiune juxtanucleară, în care se găseşte centrosomul, care poate prezenta mişcări oscilatorii. În citoplasmă se pot distinge mitocondrii extrem de fine. Uneori, mitocondriile formează o mică rozetă juxtanucleară, care înconjură centrosomul. Granulaţiile azurofile sunt variabile ca număr şi la limita de rezoluţie a microscopului optic. Ca şi alte leucocite, monocitele conţin mai multe tipuri de vacuole, dintre care cele mai numeroase sunt vacuolele contractile.

Monocitele au o tendinţă pronunţată de a adera şi de a se etala pe suprafaţa de sticlă. Forma celulei etalate este caracteristică: în centru se găsesc nucleul şi granulaţiile, iar la periferie hialoplasma abundentă şi palidă cu o margine franjurată (fig. VIII.5).

În cursul locomoţiei, monocitele iau o formă triunghiulară similară cu cea a granulocitelor, dar mişcarea este mai lentă. Caracteristic pentru monocite este mişcarea cu văluri citoplasmatice ondulante, în special

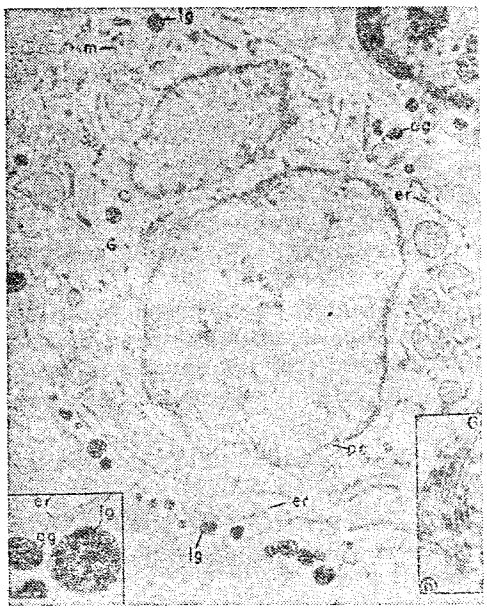


Fig. VIII.1. — Promonocit din măduva umană colorat pentru peroxidaze.

Produsul reacției este distribuit pe întregul reticul endoplasmatic rugos (*er*), inclusiv cisterna perinucleară (*pc*), cisterna Golgi *(G și săgeata)*, granulele imature (*ig*) și granulele mature (*ag*). Mitocondriile (*m*) nu conțin peroxidază. Sunt comune aglomerării de filamente (*f*) fine. În *chenarul a* se observă diferențele în concentrația produsului reacției în er, ig și ag. În *chenarul b* produsul reacției umple 6—7 cisterne ale complexului Golgi dintr-o altă celulă.

Microfotografie electronică; mărire ×12 500; pentru chenarul a: ×39 500; pentru chenarul b: ×34 500. Reprodusă după B. Nichols și colab. (21, 28).

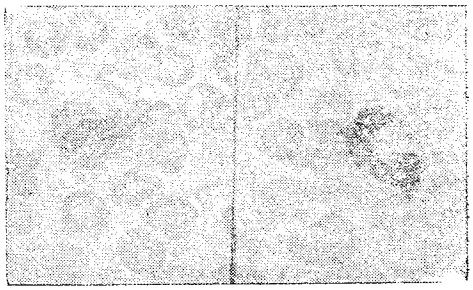


Fig. VIII.2. — Monocit sanguin (în stânga); neutrofil nesegmentat (în dreapta); monocitul are structura cromatiniană mai fină și granulații mai mici.

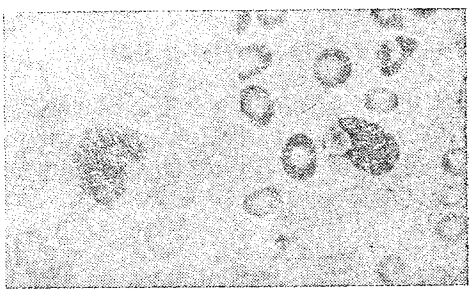


Fig. VIII.3. — Monocit sanguin cu granulații sub limita de rezoluție a microscopului optic (în stânga); monocit cu o vacuolă, care conține o particulă fagocitată (trombocit?) (în dreapta).

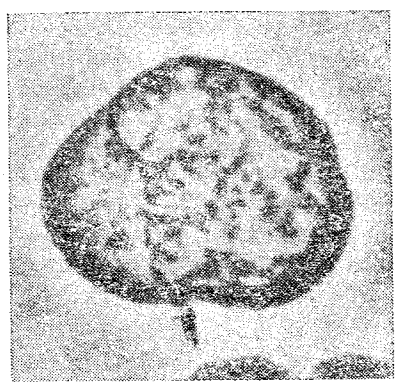


Fig. VIII.4. — Monocit sanguin observat în contrast de fază; nucleul este reniform; în citoplasmă câteva granulații (2).

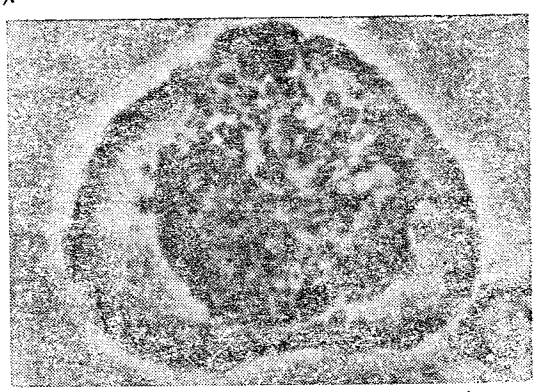


Fig. VIII.5. — Monocit sanguin observat în contrast de fază; modificări după etalare pe o suprafață de sticlă (2).

după ce au stat câteva minute în tuburile test. Vălurile monocitelor sunt mai mari decât cele ale granulocitelor.

La microscopul electronic în scanning se poate observa suprafața zbârcită și dantelată, marginea ondulantă cu franjuri a monocitelor. Aspectul suprafeței reduce forțele de respingere dintre celule și alte suprafețe și-i oferă un surplus de membrană necesar pentru locomoție și fagocitoză. De asemenea, se pot urmări diferitele etape de etalare pe suprafețele de sticlă.

La miscroscopul electronic cu transmisie nucleul conține unul sau doi nucleoli înconjurați de cromatină perinucleolară. Citoplasma conține mulți ribosomi și polisomi, puțin glicogen și reticul endoplasmatic rugos. Mitocondriile sunt mici și uneori alungite. Aparatul Golgi situat în incizura nucleului este bine dezvoltat. Sunt prezenți numeroși microtubuli și microfibrile. Granulele sunt dense, omogene și delimitate de o membrană. Granulele pot fi peroxidazo-pozitive sau negative. Ele reprezintă două populații succesive de granule mature și imature și sunt similare cu granulele azurofile și specifice de la promielocite și mielocite.

Reacțiile citochimice pot ajuta la identificarea monocitelor și diferențierea lor de granulocite. Esterazele nespecifice sunt utilizate ca un marker pentru monocite. În contrast cu esterazele din granulocite, esterazele din monocite sunt inhibate de florura de sodiu. Reacția pentru esteraze nespecifice este pozitivă în promielocite și mielocite. Ca atare, testul de inhibiție cu florură de sodiu este necesar pentru a diferenția monocitele de granulocitele imature (8). Substraturile folosite la reacțiile citochimice: naftol AS-D cloracetatul este virtual specific pentru granulocite, iar α-naftol butiratul este caracteristic pentru monocite (2).

Monocitele dau o reacție pozitivă pentru peroxidaze, dar intensitatea reacției este mai mică la monocite, în comparație cu cea din granulocite. Reacția pentru peroxidaze variază de la celulă la celulă și reflectă probabil diferențele în numărul și compoziția lizosomilor.

Atât monocitele, cât și granulocitele conțin lizozim, dar numai monocitele pot produce în mod continuu și excreta lizozim.

Macrofagele au la microscopul optic un diametru între 25 și 50 μ. Nucleul este situat excentric, cu contur oval sau reniform; frecvent apar celule cu doi nuclei. Structura cromatiniană fină prezintă densificare de-a lungul marginii interne a membranei. Nucleul poate prezenta unul sau doi nucleoli. Citoplasma este amplă, etalată, de culoare gri-pal, cu zone albăstrui sau rozate. Macrofagele conțin două populații de granulații, una constituită din lizosomi modificați, analoge cu granulațiile azurofile din neutrofile și care conțin enzime hidrolitice, necesare pentru digestia de materiale înglobate pentru fagocitoză, și a doua populație caracterizată prin absența fosfatazei alcaline și cu funcție încă necunoscută. Vacuolele sunt numeroase și variate.

La microscopul în contrast de fază se pot observa celule vii, de talie mare, în mișcare, cu o membrană ondulantă. Ca și monocitele, macrofagele aderă și se etalează pe suprafața de sticlă. Se pot observa mitocondrii alungite, lizosomi în jurul aparatului Golgi și vacuole contractile cu incluziuni lipidice.

În contrast de fază se pot urmări diversele etape de tranziție de la monocite la macrofage. Celulele cresc în dimensiune, emit numeroase prelungiri citoplasmatice, devin multinucleate, crește numărul de lizosomi și mitocondrii (fig. VIII.6 și VIII.7).

La microscopul electronic în scanning, macrofagele au aspectul unor meduze, cu prelungiri citoplasmatice fine, dantelate.

Fig. VIII.6. — Monocit sanguin, viu, observat în contrast de fază; nucleul este reniform, iar în citoplasmă se găsesc câteva granulații (6).

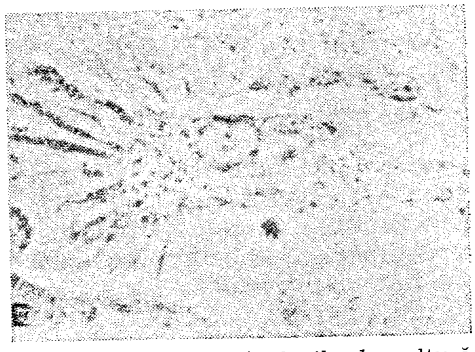


Fig. VIII.7. — După 10 zile de cultură *in vitro*, celula este mai mare, binucleată, iar în citoplasmă se găsesc numeroase granule dense (lizosomi) și mitocondrii (6).

La microscopul electronic de transmisie apar lizosomi numeroși și proeminenți, ribosomi și poliribosomi, aparat Golgi bine dezvoltat, reticul endoplasmatic neted și granular variabil, vacuole, tubuli și fibrile. Se pot observa frecvente fenomene de pinocitoză și fagocitoză, cu formarea de vacuole secundare.

Reacțiile citochimice sunt similare cu cele de la monocite (esteraze nespecifice pozitive, secreție și excreție de lizozim). Toate produsele de origine lizosomală cresc când macrofagele devin „*activitate*" în cursul reacțiilor inflamatorii sau imunologice.

Fagocitele mononucleare exprimă un mare număr de *antigene de suprafață (receptori)*, care au fost caracterizate cu anticorpi monoclonali specifici; se cunosc peste 50 de varietăți, printre care: receptori Fc, HLA-DR (Ia), Mac 1, CD4, receptori pentru complement, pentru oligozaharide (lectine) ș.a. Aceste antigene servesc și ca markeri pentru a stabili originea, diferențierea și funcția acestor celule (8).

În esență, macrofagele au dimensiuni mai mari decât monocitele din care provin, cu prelungiri citoplasmatice impresionate, în continuă mișcare. Celulele pot fi multinucleate, fie prin fuzionare de celule, fie prin endomitoză. Modificarea morfologică cea mai importantă din cursul maturației este creșterea numărului și dimensiunilor lizosomilor și a mitocondriilor. Simultan, *biochimic* se constată creșterea activității de enzime lizosomale (fosfataza acidă, beta-glucuronidaza, catepsina, arilsulfataza și lizozimul). Aparatul Golgi, puțin dezvoltat la monocite, crește în dimensiune și complexitate la macrofage. Se presupune că enzimele lizosomale sintetizate în reticulul endoplasmatic sunt înmagazinate de aparatul Golgi în lizosomi primari. Aceștia se unesc ca vacuole

fagocitare și pinocitare și formează structuri combinate, numite lizosomi secundari. Lizosomii secundari sunt bogați în enzime hidrolitice. *In vitro*, producția de enzime hidrolitice este stimulată de pinocitoză, fagocitoză, unii polianioni și de concentrațiile mari de proteine din mediu. Odată cu maturația, crește și activitatea enzimelor mitocondriale (citocrom oxidaza), ritmul respirației celulare, utilizarea glucozei și producția de acid lactic.

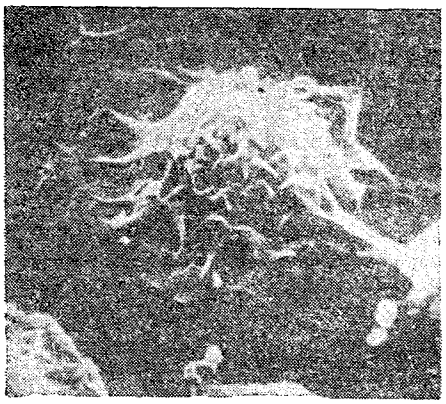


Fig. VIII.8. — Macrofag alveolar, recoltat de la un fumător; celula este etalată pe o suprafață de sticlă; se observă membrana ondulată și lamelipodia atașate la substrat; microfotografie electronică în scanning (6).

Fig. VIII.9. — Macrofag alveolar, obținut prin lavaj bronșic de la un mare fumător de țigarete; se observă așanumitele *„particule ale fumătorilor"* (incluziile dense); microfotografie electronică (6).

Macrofagele tisulare sunt celule mai mari, metabolic mai active și cu un arsenal mai bogat de enzime hidrolitice decât monocitele sanguine din care provin. Aceste diferențe structurale și metabolice se reflectă în capacitatea funcțională mult mai mare a macrofagelor.

Morfologia și structura diverselor tipuri de macrofage sunt extrem de variate și reflectă influența micromediului local în diferențierea lor finală. Aplicarea bronhoscopiei fibrooptice a permis recoltarea de macrofage rezidente în spațiile bronhoalveolare și studierea morfologiei și funcțiilor lor în stare normală și patologică. Macrofagele alveolare al fumătorilor de țigarete, de exemplu, se etalează mai rapid și mai intens pe suprafețe de sticlă decât cele normale (fig. VIII.8) (6). Aceste macrofage conțin în interiorul fagolizosomilor *„particule ale fumătorilor"* caracteristice (fig. VIII.8 și VIII.9) (6).

CICLUL DE VIAȚĂ

În fig. VIII.10 este prezentată schema dezvoltării liniei monocito-macrofagice și influența *„factorilor de creștere hematopoietici"* asupra diferitelor etape de diferențiere și maturație (12).

Ca toate celulele sanguine, fagocitele mononucleare au originea în celulele stem pluripotente (CSP) din măduvă. Acestea dau naștere la celule progenitoare multiliniare sau *celule formatoare de colonii pentru granulocite, eritrocite, monocite și megacariocite (CFC-GEMM).* Din acestea rezultă celule bipotente sau *celule formatoare de colonii pentru gra-*

nulocite și monocite (CFC-GM). CFC-GM proliferează și se diferențiază sub influența unor factori de creștere hematopoietici, și anume *interleukina 3 (IL-3)* și *factorul de stimulare a coloniilor gronulocitomonocitare (FSC-GM).* Acești factori de creștere sunt produși în micromediul medular de celulele endoteliale și de fibroblaști. În 5—7 zile, CFC-GM

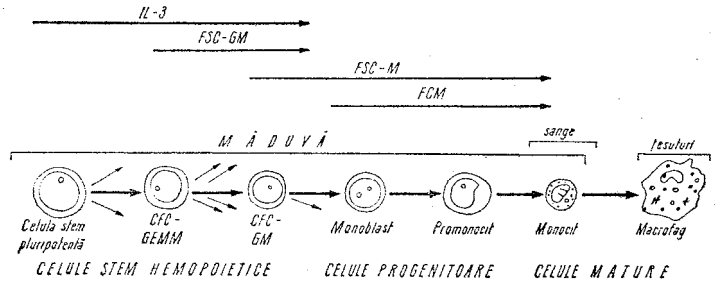


Fig. VIII.10. — Schema dezvoltării fagocitelor mononucleare și influența factorilor de creștere hematopoietici (după R. van Furth, 1992) (12).

IL-3: interleukină 3; FSC-GM: factor de stimulare a coloniilor granulocitomonocitare; FSC-M: factor de stimulare a coloniilor monocitare; FCM: factor de creștere a monocitozei; CFC-GEMM: celule formatoare de colonii multipotente pentru granulocite, eritrocite, monocite și megacariocite; CFC-GM: celule formatoare de colonii bipotente pentru granulocite și monocite.

sunt orientate fie spre o diferențiere neutrofilică, fie spre una monocitară. Ele poartă denumirea de *celule formatoare de colonii granulocitare (CFC-G)* și, respectiv, *celule formatoare de colonii monocitare (CFC-M).* În această etapă de diferențiere, aceste celule sunt reglate de concentrațiile locale ale factorilor de creștere specifici pentru linia respectivă, și anume: *factorul de stimulare a coloniilor granulocitare (FSG-G)* și *factorul de stimulare a coloniilor monocitare (FSC-M)* (29). Necesitatea de monocite la nivelul teritoriilor de inflamație este semnalată la nivelul măduvei de factorul de creștere a monocitozei (FCM), eliberat de macrofage în cursul procesului de fagocitoză (12). Celulele progenitoare (monoblaștii și promonocitele) au o cale de evoluție restrânsă (unipotentă).

Monoblaștii nu pot fi identificați cu tehnicile curente pe frotiurile de măduvă normală.

Promonocitele sunt primele celule precursoare identificabile pe frotiurile de măduvă normală. Ele au anumite caracteristici morfologice, structurale și funcționale, descrise anterior. Promonocitele au capacitatea de mitoză și formează compartimentul de proliferare a acestei serii celulare. Prin maturare, promonocitele dau naștere la monocite.

Monocitele din măduvă ($\sim 7{,}3 \times 10^9$ celule) rămân puțin timp ($\sim$24 h) în spațiile medulare și apar rapid în sânge. Nu există un rezervor medular de monocite, așa cum există unul de granulocite. Spre deosebire de granulocite, monocitele sunt celule încă imature, în tranzit de la locul de origine medular către țesuturi. Spre deosebire de neutrofile, monocitele reprezintă o populație celulară minoră în sânge. La adultul normal, numărul total de monocite circulante din sânge este în jur de $1{,}7 \times 10^9$,

variind între 1 și 9% din totalul leucocitelor, iar numărul absolut între 150 și 650/mm^3 (400$\pm$250).

La embrion monocitele sunt printre primele celule ce apar în sacul amniotic. În primele două săptămâni de viață, numărul absolut de monocite din sânge este în jur de 1 000/mm^3. La copii, numărul relativ de monocite din sânge este de 9%, iar numărul absolut variază între 750 și 800/mm^3. Bărbații au un număr puțin mai mare de monocite decât femeile. Perioada de formare din monoblast a unui monocit circulant este în jur de 5 zile.

S-a descris o oscilație a numărului absolut de monocite din sânge, cu o periodicitate de ~5 zile. Această oscilație corespunde cu cea descrisă la nautrofile și trombocite. Ea a fost atribuită prezenței mecanismului de autoreglare, în care un *feed-back* negativ leagă compartimentul sanguin și cel tisular de cel medular.

S-a semnalat o monocitoză falsă la pacienții cu o boală vasculară periferică sau sindrom Raynaud, când recoltarea sângelui se face din pulpa degetului.

Circuitul lor este unidirecțional: măduva→sânge→țesuturi, în contrast cu limfocitele, care recirculă. În sânge, monocitele se distribuie între rezervorul marginal și central. Ele au o mică capacitate de proliferare. Monocitele rămân în circulație în medie 3 zile, după care migrează și se localizează în diverse țesuturi și organe. Numărul de monocite care părăsește circulația a fost apreciat la $1{,}6\times10^7$ pe oră sau 40×10^7 pe zi. Migrarea monocitelor sanguine prin pereții vasculari în țesuturi este favorizată de *moleculele de adeziune,* a căror expresie este controlată de o varietate de citokine (12). După ce monocitele au intrat în țesuturi, ele nu mai sunt capabile de a se întoarce în circulație. În țesuturi, sub influența micromediului local, monocitele suferă o hiper- sau postmaturație, devin active funcțional, transformându-se în macrofage. Ele se măresc cu de 5—10 ori față de dimensiunea anterioară, își măresc capacitatea fagocitară și conținutul în enzime hidrolitice, în lizosomi, își cresc numărul de mitocondrii energogene și își sporesc aparatul Golgi pentru a produce lizosomii. Ajunse în țesuturi, ele au două posibilități: devin macrofage tisulare fixe sau se întorc în sânge.

Macrofagele tisulare sunt o populație de celule extrem de heterogene ca morfologie și topografie. Celulele ce se fixează în țesuturi emit ramificații fine (dendrite) prin care se fixează și devin macrofage fixe. Fixarea nu este însă obligator permanentă; astfel, în cazul unei infecții de vecinătate, ele se pot deplasa. Ele au diverse aspecte în funcție de organul sau țesutul unde se localizează. Mult timp ele au fost considerate tipuri celulare separate. Din grupa macrofagelor tisulare fac parte: celulele Kupffer din ficat, macrofagele alveolare din plămâni, celulele Langerhans din piele, celulele microgliale din creier, macrofagele peritoneale și pleurale, celulele „litoral" din splină, celulele mezangiale din rinichi, osteoclastele din oase, celulele gigante din granulom și celulele nurse din insulele eritropoietice în măduva osoasă.

Celulele Langerhans au fost descrise inițial în epiderm (Langerhans, 1868). Ulterior, s-a constatat că ele migrează și au o răspândire largă în diferite țesuturi și organe. În căile limfatice aferente, ele iau aspectul

de *„celule cu văluri"*, iar în zona paracorticală a ganglionilor limfatici, zona medulară din timus și tecile periarteriolare din splină sunt cunoscute sub denumirea de *„celule interdigitate"* (19, 23).

Originea mielogenă a diferitelor tipuri de macrofage a fost demonstrată cu diverse metode. S-au adus dovezi asupra originii medulare a macrofagelor alveolare, hepatice și ale celulelor Langerhans, folosindu-se markeri cromosomiali de sex la pacienții la care s-a făcut transplantare de măduvă osoasă alogenă (22). Studii de transplantare de măduvă în osteopetroza malignă infantilă au arătat că osteoclastele sunt și ele legate ca origine de seria monocitomacrofagică (7). Studii la șobolani au confirmat, de asemnea, originea medulară a celulelor microgliale perivasculare din SNC (18).

Unele macrofage tisulare (hepatice și pulmonare) sunt capabile de sinteză de ADN și de replicare. Proliferarea acestor macrofage rezidente este reglată de factori locali. Replicarea macrofagelor tisulare poate deveni un mecanism important în procesul de formare al leziunilor histiocitare localizate. Macrofagele se pot uni între ele, formând celule epitelioide, care suferă apoi o citoliză, ca în centrul necrotic al ganglionului tuberculos. În leziunile inflamatorii cronice s-a urmărit cu markeri cromosomiali fuziunea monocitelor cu macrofagele și formarea de celule gigante multinucleate. În culturi de macrofage, adăugarea unui factor stimulator solubil, eliberat din limfocitele T (CD4+ și CD8+) umane, probabil interferonul gamma (IFNγ), induce formarea de celule gigante.

Raportul dintre numărul de macrofage tisulare și numărul de monocite circulante a fost estimat la 400:1. Numărul de macrofage tisulare depinde de influxul de monocite migratorii și mai puțin de diviziunea locală a acestor celule (12).

Macrofagele trăiesc în țesuturi câteva luni, spre deosebire de granulocite, care supraviețuiesc numai câteva zile. Distrugerea macrofagelor se face în special în alveolele pulmonare și lumenul intestinal.

Pe lângă macrofagele fixe, tisulare, există și *macrofage libere* în cavitățile seroase (macrofage peritoneale, pleurale, sinoviale) sau în țesuturi conjunctive (histiocite).

Reglarea producției de fagocite mononucleare. Ca la orice sistem celular proliferativ, producția de celule din seria monocitomacrofagică depinde de balanța dintre *factorii umorali stimulatori și inhibitori*. Informațiile despre acești factori umorali se bazează în special pe studiile făcute *in vitro* și mai puțin pe cele făcute *in vivo*.

În fig. VIII.11 se prezintă un model de reglare a producției de fagocite mononucleare (15). Sub influența unor stimuli externi (particule de fagocitat, stimuli imuni, endotoxine), macrofagele secretă doi hormoni hematopoietici: *factorul stimulator de colonii monocitare (FSC-M)* și *factorul stimulator de colonii granulacitomonocitare (FSC-GM)*. Acești factori sunt capabili să stimuleze producția de fagocite mononucleare. În plus, macrofagele elaborează două citokine: *interleukina 1 (IL-1)* și *factorul de necroză tisulară (FNT)*, care induc două tipuri de celule non-hematopoietice (celulele endoteliale și fibroblaștii) să secrete FSC-M și FSC-GM. A treia cale de stimulare este reprezentată de limfocitele T, activate, care produc *interleukină 3 (IL-3)* și FSC-GM. Aceste citokine interacțio-

nează cu proliferarea fagocitelor mononucleare în răspunsurile imune de hipersensibilitate întârziată cu formarea de granuloame. Macrofagele secretă şi inhibitori, cum sunt *prostaglandinele din seriile E (PGE)*, care au acţiune negativă, de supresie a proliferării monocitomacrofagice. Apare evident faptul că macrofagele, celulele terminale ale acestei serii, joacă

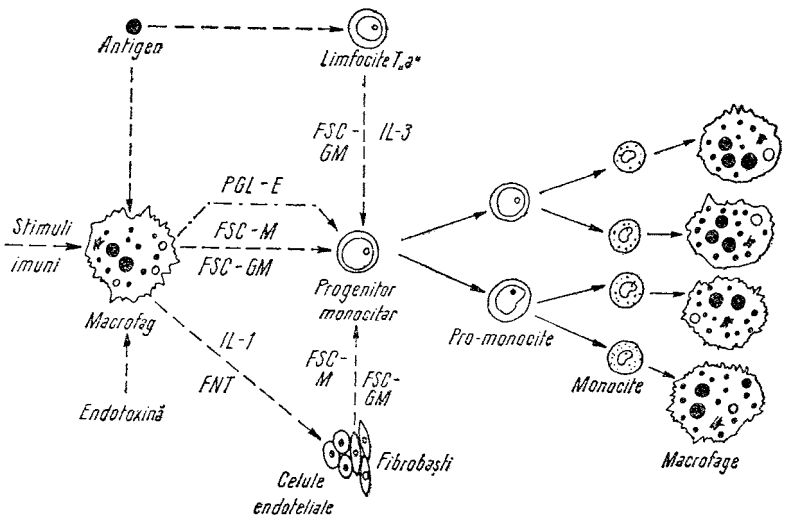


Fig. VIII.11. — Reglarea producţiei de fagocite mononucleare (modificat după D. W. Golde şi J. E. Groopman, 1990) (15).
FSC-GM: factor de stimulare a coloniilor monocitare; FSC-GM: factor de stimulare a coloniilor granulocito-monocitare; IL-1: interleukină 1; FNT: factor de necroză tisulară; IL-3: interleukină 3; PGL-E: prostaglandine din seriile E; limfocite T „a": limfocite T activate; ⟶: stimulare; ⇢: inhibare.

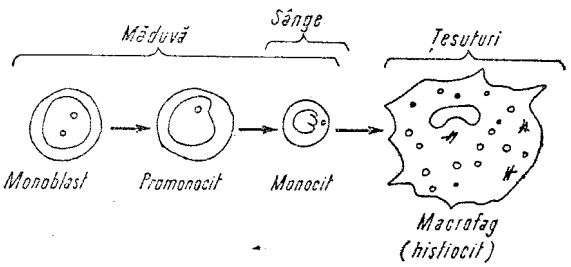
un rol central în mecanismul de reglare, care, în mare parte, are un caracter de *autoreglare*.

Factorii stimulatori (FSC-M şi FSC-GM) au fost intens studiaţi atât *in vitro*, cât şi *in vivo*. FSC-M (FSC-1) este un homodimer de 70 000—90 000 de daltoni, care este codificat de o genă unică, localizată pe braţul lung al cromosomului 5 (5). Receptorul pentru FSC-M este produsul unei protooncogene, *c-fms*, care, de asemenea, se găseşte pe braţul lung al cromosomului 5 (30). Receptorul FSC-M este prezent pe fagocitele mononucleare şi are o activitate protein kinazică. FSC-GM este o glicoproteină de 22 000 de daltoni, care acţionează asupra precursorilor monocitelor, neutrofilelor şi eozinofilelor. El poate, de asemenea, activa macrofagele în repaus. Receptorul pentru FSC-GM nu a fost izolat, dar se ştie că există pe neutrofilele mature, pe monocite şi eozinofile. Dintre cei doi factori stimulatori (FSC-M şi FSC-GM), FSC-M este *„candidatul"* principal pentru reglarea zilnică a producţiei de monocite. S-a demonstrat că FSC-M circulă în sânge şi este excretat prin urină. Administrarea de *FSC-M biosintetic* duce la creşterea numărului de promonocite şi monocite. Incubarea monocitelor murine cu FSC-GM produce o creştere a metabolismului, cu mărirea consumului de glucoză şi producerea de acid

lactic. Aceste modificări metabolice sunt asociate cu o etalare rapidă și o lărgire a monocitelor pe suprafețele de sticlă. Sinteza de ARN și de proteine crește, dar sinteza de ADN nu este influențată. În același timp, este mult stimulată capacitatea de endocitoză (12).

FUNCȚII

Filogenetic, macrofagele ar putea fi considerate un tip celular primitiv, întrucât au caractere similare cu unele protozoare unicelulare. La om, macrofagele sunt dotate și cu capacitate de a distinge *self-ul de non-self* și de a diferenția *self-ul senescent* și neoplazic de self-ul normal. Această funcție cognitivă celulară este legată de prezența pe suprafața macrofagelor a receptorilor pentru Ig, complement, limfocite și complexe imune (fig. VIII.12) (15). Datorită participării sale la numeroase



Sinteza de ADN (proliferarea)	+++	+++	+	+/—
Aderența la sticlă	0	+	++	+++
Lizosomii	0	+	++	+++
Fagocitoza	0	±	+	+++
Receptorii IgG	0	+	++	+++
Interacțiunea cu limfocitele	0	?	++	+++

Fig. VIII.12. — Dezvoltarea unor caracteristici biologice, structurale și funcționale ale fagocitelor mononucleare în raport cu maturația (15).

funcții, macrofagul este o celulă secretorie, extrem de activă; aproximativ 100 de substanțe au fost indicate ca fiind secretate de macrofage. Tabelul 8.II prezintă principalele substanțe secretate de macrofage. Spre deosebire de alte fagocite (neutrofile, eozinofile), macrofagele se pot găsi în trei stări: în repaus, activate și hiperactivate.

Macrofagele pot fi „activate" de diverși stimuli. Astfel, în cursul unei infecții, activarea macrofagelor este realizată prin eliberarea de către

TABELUL 8.II

Substanțe secretate de macrofage

Componente ale complementului

C1—C5
Factor B
Factor D
Properdină
C1-INH
Factor I
Factor H

Factori de coagulare și de fibrinoliză

V
VII
IX
X
Tromboplastină
Protrombină
Activatorul plasminogenului

Peptide

Glutation

Inhibitori enzimatici:

Inhibitor al plasminei
α-2 macroglobulină

Proteine de fixare:

Transferină
Transcobalamină II
Fibronectină
Apolipoproteine

Nucleoside:

Timidină
Uridină
Adenosină
Guanosină
Acid uric, cAMP
X
Factor activator plachetar (PAF)

Metaboliți reactivi ai oxigenului:

Anion superoxid
Peroxid de hidrogen
Radicali hidroxili
Oxigen

Metaboliți ai acidului arahidonic:

Prostaglandină E_2
Prostaglandină F_{2a}
Prostaciclină
Tromboxan A_2

Produse ale lipoxigenazei:

Leucotrien B_4
Leucotrien C_4
Leucotrien D_4
Leucotrien E_4
HETE
5
12
15

Factori de creștere pentru:

Limfocite B și T
Progenitori mieloizi (GM-CSF)
Mononucleare fagocite
Progenitori eritrocitari
Eritropoietină
Fibroblaști
Endotelii capilare
Factor de creștere derivat din plachete (PDGF)
Factori chemotactici pentru neutrofile

Factori ce reglează sinteza proteinei din:

Amiloidul seric
Haptoglobină
Colagenază
Activatorul plasminogenului

Hidrolaze neutre:

Muramidază
Colagenază
Elastază
Convertază a angiotensinei
Protează de degradare a proteoglicanilor
Stromelizină

Hidrolaze acide:

Proteaze
Esteraze
Peptidaze
Lipaze
Fosfolipaze
Ribonuclează
Fosfataze
Glicozidaze
Hexosaminidaze

(Continuarea tabelului 8.II)

Sulfataze Catepsină	*Citokine:* IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, GM-CSF Interferon α, β, TNFα
Alte enzime: Arginaze Lipoproteinlipază Lizozim	*Factori liberatori de histamină (HRF)* Colesterol Factor de angiogeneză
Factori ce inhibă creşterea: Celulelor tumorale Limfocitelor Precursorilor mieloizi *NO*	

limfocitele T, sensibilizate specific la antigenele agentului infectant, a unor limfokine cum sunt interferonul γ şi GM-CSF. Macrofagele activate devin nu numai celule intens fagocitare, ci şi celule secretorii pentru o mare varietate de substanţe active biologic (hidrolaze acide, componente ale complementului, interleukină 1, factor de necroză tumorală, prostaglandine, interferon etc.). Conceptul de macrofage activate este important pentru înţelegerea participării macrofagelor la apărarea împotriva infecţiilor, îndepărtarea detritusurilor celulare şi a particulelor anorganice (de exemplu, componente de fum sau praf inhalat), modularea inflamaţiei şi a răspunsurilor imune, îndepărtarea celulelor senescente şi, posibil, rejecţia celulelor tumorale. Activarea este cel mai important pas în maturarea macrofagelor. Ea este declanşată de citokine mediate de limfocite (limfokine), printre care şi interferonul gamma (IFNγ), secretat de limfocitele CD4 şi CD8 şi de celulele *„natural killer"* (NK) (12), de unii hormoni, de mediatori ai inflamaţiei şi de lipopolizaharidele din pereţii celulelor bacteriene. Macrofagele activate prezintă diferenţe morfologice, structurale, metabolice şi funcţionale faţă de celulele în repaus: devin mai mari, cresc formarea de pseudopode, mobilitatea, numărul de vezicule pinocitare, metabolismul celular, capacitatea de aderenţă, activitatea enzimelor lizosomale, producerea de agenţi oxidanţi letali, capacitatea de distrugere micobacteriilor, virusurilor, fungilor, protozoarelor şi celulelor tumorale. În cursul infecţiilor, activarea se face prin limfokinele eliberate de limfocitele T sensibilizate specific la antigenele agentului infectant şi de alţi mediatori ai inflamaţiei, precum şi de lipopolizaharidele bacteriene. În absenţa limfokinelor, agenţii infectanţi pot rămâne şi pot prolifera în interiorul macrofagelor şi sunt inaccesibili pentru granulocite sau alte sisteme citotoxice. În contact cu endotoxina bacteriilor gram-negative, macrofagele eliberează factorul de necroză tumorală α (FNTα) (caşectina), care poate el însuşi activa aceste celule în anumite condiţii *in vitro*.

Macrofagele activate sunt hiperactivate ca răspuns la componente ale peretelui celulelor bacteriene, ca lipopolizaharide, sau de către o limfokină încă neidentificată. Hiperactivarea are de obicei loc la sediul inflamaţiilor sau al proliferărilor tumorale. Ea creşte proprietatea macrofagelor de a ingera microorganisme şi le conferă capacitatea de a omorî paraziţi prea mari pentru a putea fi ingeraţi. Macrofagele hiperactivate diferă atât morfologic, cât şi funcţional de macrofagele activate. Ele

pot reduce creşterea celulelor tumorale fie prin efecte citostatice (oprirea proliferării), fie prin efecte citolitice.

Termenul de *monokine* este folosit pentru descrierea factorilor proteinici şi peptidici secretaţi de monocite şi macrofage. Din această categorie fac parte: factorii stimulatori de colonii, factorul de activare neutrofilic, interleukinele, interferonii, factorul de necroză tisulară, proteinele inflamatorii macrofagice şi factorii de creştere şi transformare (29).

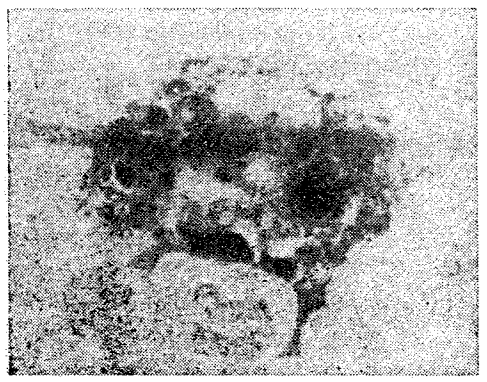


Fig. VIII.13. — Macrofag care a fagocitat şi digerat eritrocite; reacţia Perls a demonstrat prezenţa în citoplasmă a unor granule de hemosiderină (2).

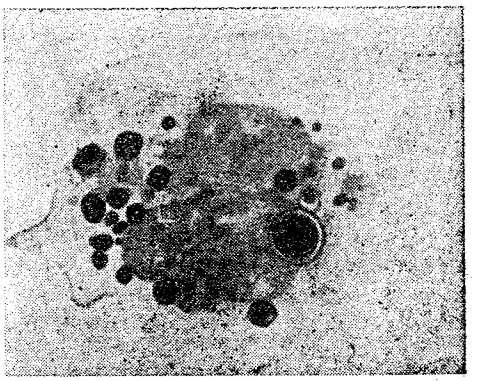


Fig. VIII.14. — Reprezentarea schematică a macrofagului din figura alăturată.

Monocitele şi macrofagele au capacitateta de a migra într-o anumită direcţie spre diverşi stimuli, reprezentaţi de produse bacteriene, componente activate ale complementului (C5a) şi factori chemotactici eliberaţi de limfocitele T sensibilizate, care suferă reacţii imune specifice, de neutrofile sau de celule tumorale. Această proprietate poartă denumirea de chimiotactism. Pentru funcţia protectoare a monocitelor este importantă proprietatea lor de a traversa prin diapedeză peretele endotelial al vaselor şi de a migra la nivelul focarului de infecţie şi a invaziei microbiene în ţesuturi.

Fagocitele mononucleare pot ingera o varietate de particule, ca latex, carbon, microorganisme, detritusuri celulare şi celule senescente, fenomen care poartă numele de fagocitoză (fig. VIII.13; VIII.14; VIII.15; VIII.16). Materialul fagocitat este digerat incomplet şi o mică parte din acesta rămâne în interiorul macrofagelor. Acestea se deplasează către organe şi celulele imunoreactive, unde prezintă antigenul prelucrat limfocitelor T helper-inductor. Macrofagele au receptori de membrană pentru fragmentul Fc al IgG şi componenta C3b a complementului, precum şi pentru limfokine, peptide bacteriene, lizozim, leucotriene şi PG1. Microbii opsonizaţi, înveliţi de Ig sau C3b se ataşează de suprafaţa externă a macrofagelor prin receptorii Fc sau C3b. Fagocitoza microorganismelor invadante este influenţată de prezenţa sau absenţa opsoninelor-anticorpi, a complementului activat şi, posibil, a fibronectinei, ca şi de proprietăţile de suprafaţă ale microorganismelor.

Activitatea bactericidă. Neutrofilele și macrofagele formează *sistemul major de apărare antimicrobiană* (imunitate nespecifică). Mulți microbi sunt fagocitați și distruși fie de neutrofile, fie de macrofage. Unii germeni patogeni sunt fagocitați în mod preferențial de macrofage. Din această categorie fac parte: *Listeria, Salmonella, Brucella, Mycobacterium, Rickettsia, Leishmania, Toxoplasma, Trypanosoma* și *Legionella pneumophila*, precum și unii fungi. Acești germeni parazitează și se pot

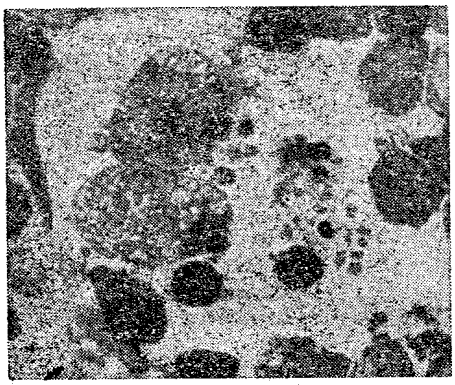


Fig. VIII.15. — Macrofag care a fagocitat și digerat limfocite; amprentă din aspirat ganglionar (2).

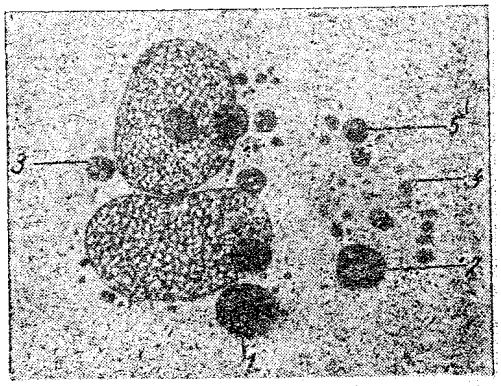


Fig. VIII.16. — Reprezentarea schematică a macrofagului din figura alăturată; sunt notate (de la 1—5) diversele etape de digestie ale celulelor fagocitate.

replica în interiorul macrofagelor inactive. Limfokinele, eliberate de limfocitele sensibilizate, activează macrofagele, care distrug microorganismele prin generare de peroxizi de hidrogen, superoxizi și radicali hidroxilici și de intermediari de azot, toți toxici. Citokinele care acționează pe macrofage pentru a genera acești produși sunt numeroase, ca de exemplu GM-CSF și FNTα. Cum rezultatele activării macrofagelor sunt potențial nocive pentru organism, intră în acțiune factori solubili recent descoperiți care inactivează macrofagele (factorul de activare al macrofagelor MDF și factorul de creștere transformator β, TGF-β).

Macrofagele pot produce interferon, care are rol în protecția împotriva infecțiilor virale. S-a demonstrat că virusul imunodeficienței umane (HIV) se localizează și se replică în interiorul monocitelor și macrofagelor (24). Aceasta duce la o creștere a eliberării de IL-1 și FNT, care acționează ca pirogeni endogeni, fiind responsabili pentru febra cronică a bolnavilor. HIV poate exista ca un provirus integrat în ADN sau ca un virion în citoplasma fagocitelor mononucleare.

Macrofagele mai produc o serie de factori citotoxici, cum sunt radicali de oxigen și de oxid de azot, IL-1, IL-6, FNTα, prostaglandine și leucotriene care lezează barierele vasculare și acționează și ca semnale chemotactice pentru leucocitele din sânge.

Macrofagele atacă și virusuri pe care le ingeră prin fagocitoză și le distrug în vacuolele lor fagocitice. Există însă și virusuri care nu numai că nu sunt distruse în aceste vacuole, ci se pot chiar înmulți în acestea. Macrofagele cu asemenea virusuri ajung prin limfă în ganglionii limfatici, unde un al doilea front de macrofage situate în nodu-

rile sinusale atacă virusurile. Dacă și această linie de apărare a eșuat, macrofagele respective sunt duse prin sânge în diverse organe, cum este ficatul, bogate în celule ale sistemului macrofage-fagocite.

În rezistența la unele infecții cu paraziți — protozoare sau stadii de dezvoltare a unor paraziți metazoari, cu dimensiuni accesibile macrofagelor fagocitare — fagocitoza macrofagică are un rol important.

Modularea răspunsului inflamator. Macrofagele secretă multiple substanțe adaptate diferitelor faze ale răspunsului inflamator (31).

În *faza de inflamație acută,* ele secretă mediatori de prostaglandine, factor de activare trombocitar, enzime proteolitice, lizozim, componente ale complementului și properdinei. Acești mediatori atrag în focarul inflamator și alte celule, ca de exemplu granulocitele. În plus, macrofagele secretă IL-1 și factorul de necroză tumorală α, care provoacă febra prin intermediul centrului reglator al temperaturii din hipotalamus.

În procesul inflamator macrofagele interacționează cu diversele celule de inflamație implicate în proces:

— *Macrofagele și neutrofilele.* După începutul reacției inflamatorii are loc o migrare a leucocitelor către locul inflamației. Macrofagele generează mediatori chemotactici pentru migrarea neutrofilelor, printre care IL-1, HETE, LTB_4. Ele joacă totodată un rol important pe calea acțiunii IL-1 și FNT produse de ele, care cresc expresia de molecule de adeziune atât în celulele endoteliale, cât și în neutrofile, în adeziunea neutrofilelor de pereții endoteliali vasculari, pas important pentru migrarea neutrofilelor. Macrofagele eliberează și factori care activează granulocitele, cum este GM-CSF, care le stimulează creșterea și activarea. A mai fost descris (Dasscin și colab.) un factor, încă incomplet caracterizat, care crește în anumite condiții capacitatea neutrafilelor și eozinofilelor de a sintetiza și elibera LTB_4 și LTC_4.

— *Macrofagele și eozinofilele.* Mediatori eliberați de macrofage, cum sunt LTB_4, HETE-5 și în special factorul activator plachetar (PAF), sunt chemotactici pentru eozinofile. Recent a mai fost identificat un factor care crește degranularea eozinofilelor și producția lor de anioni superoxid și peroxid de hidrogen și producția de leucotriene.

— *Macrofagele și mastocitele.* Macrofagele induc eliberarea de histamină și mastocite pe calea IL-1 și a unui factor eliberator de histamină (HRF).

În *faza de inflamație cronică,* macrofagele secretă factori de coagulare și de fibrinoliză, ca activatorul plasminogenului care duce la producția crescută de plasmină și la liza cheagului, proteinaze neutre care îndepărtează detritusurile, agenți care favorizează migrarea și proliferarea fibroblaștilor și a celulelor endoteliale. În acest fel, după acțiunea de curățire a focarului inflamator, se produce refacerea țesutului conjunctiv.

Pentru pregătirea celui de-al doilea contact cu substanțele străine, macrofagele secretă factori de activare a limfocitelor, ca IL-1, care favorizează reacțiile imune prin activarea limfocitelor T cu producere de limfokine și proliferarea limfocitelor B, cu producere de anticorpi. Sinteza crescută de IL-1 de către macrofagele activate contribuie la creșterea răspunsului imun.

Inițierea și modularea răspunsului imun. *Celulele prezentatoare de antigen.* Pe lângă rolul lor important în imunitatea nespecifică, macrofagele cu rol de celule fagocitare care se acumulează în reacția inflamatorie, participă activ la imunitatea specifică, în care intervin atât în faza de inițiere a răspunsului imun (prelucrarea și prezentarea antigenului, cooperare directă sau mediată prin limfokine și monokine cu limfocitele T și B etc.), cât și în faza efectoare a acestuia (prin acțiuni diverse, de exemplu citostatice, citolitice ș.a. ale macrofagului activat).

Printre macrofagele rezidente în țesuturi a fost identificată o populație celulară numită *celule prezentatoare de antigen* a limfocitelor T și B. Din această populație fac parte și celulele Langerhans din piele, celulele interdigitate din timus și celulele dendritice foliculare din centrii germinativi ai ganglionilor limfatici (vezi și tabelul 10.IV, capitolul Seria limfoplasmocitară).

În unele cazuri, ca de exemplu în astmul bronșic, celulele epiteliale acționează sinergic cu macrofagele în prezentarea antigenului limfocitelor T.

Prezentarea antigenilor limfocitului T se poate face pe două căi: antigenii intracelulari sunt de obicei menținuți în citosol și sunt prezentați în context cu moleculele de clasa I a CMH, pe când antigenii exogeni sunt în general prelucrați pe care exterosomală și asociați cu molecule de clasa II a SMH. Ca celule prezentatoare de antigen macrofagele au un rol cheie în determinarea dacă un răspuns imun celular induce protecția gazdei sau permite supraviețuirea agentului infecțios. Moleculele CMH dirijează sistemul imun către răspunsuri mediate fie de limfocite TCD_4^+ sau TCD_8^+

Recunoașterea antigenelor de către limfocitele T. Limfocitele T recunosc așadar antigenele numai după ce ele au fost prelucrate de macrofage și s-au asociat cu elemente de restricție, reprezentate de glicoproteinele „*self*" ale macrofagelor. Acestea sunt codificate de complexul de histocompatibilitate major (CHM). Restricția CHM pentru recunoașterea antigenelor este diferențiată. Moleculele CHM din clasa I servesc ca elemente de restricție pentru un subset de limfocite T (CD_8 sau T_8 citotoxic/supresor). Moleculele din clasa a II-a acționează ca elemente de restricție pentru un alt subset de limfocite T (CD_4 sau T_4 *helper/inductor*). Moleculele din clasa a II-a au fost numite și molecule de „activare imună" (Ia) (16).

Interrelația dintre macrofage și limfocitele T și B mediată de citokine. Macrofagele activate produc IL-1 și FNT care stimulează elaborarea de către limfocitele T țintă a unor limfokine (IL-2, INFγ, FSC-GM și IL-3) care au acțiuni multiple asupra macrofagelor: cresc chemotactismul macrofagelor care exprimă antigen Ia, le inhibă migrarea și le crește capacitatea citociclală (16).

După interacțiunea dintre macrofage și limfocitele T urmează interacțiunea dintre limfocitele T și B și producția de imunoglobuline, fenomene care vor fi descrise în capitolul privind seria limfocitară. Prin intermediul IL-1 macrofagele stimulează proliferarea și diferențierea limfocitelor B amorsate de antigen în plasmocite secretoare de anticorpi.

Recent (20), s-a atras atenția asupra rolului macrofagelor SNC (celu-

lele microgliale) în demielinizarea mediată imun, tulburare esențială în unele boli neurologice (scleroza multiplă și sindromul Guillain—Barré). Celulele microgliale inițiază inflamația locală mediată imun, după ce ele au fost activate de celulele T invadante. În nevritele alergice experimentale s-au găsit multe macrofage asociate cu axoni demielinizați și care conțineau detritusuri de mielină fagocitate.

Îndepărtarea celulelor sanguine senescente și anormale. Macrofagele fixe ale splinei („celulele litoral") sunt implicate în sechestrarea și distrucția eritrocitelor senescente (gericite) sau patologice (sferocite). Eritrocitele senescente fixează cantități crescute de Ig, care sunt recunoscute și fixate de receptorul Fc de pe suprafața macrofagelor. Macrofagele activate sunt capabile să ingereze și celule învelite cu componente ale sistemului complement. Îndepărtarea leucocitelor și trombocitelor alterate se face probabil prin mecanisme similare.

Macrofagele din măduvă, situate în centrul *„insulei eritroblastice"*, au rol în eritrofagocitoză, în degradarea Hb, în stocajul și transferul Fe spre eritroblaști. Macrofagele hepatice (celulele Kupffer) fagocitează și ele eritrocite și alte celule. Așezarea lor strategică în sinusoidele hepatice ca și faptul că ele constituie cea mai mare aglomerare de macrofage din corp le atribuie o funcție importantă în epurarea sângelui din teritoriul splahnic de material străin și imunoreactiv; ele sunt și rezervoare pentru Fe. Macrofagele din alveolele pulmonare, lamina propria din tractul gastrointestinal, peritoneu și pleură au funcții specifice de fagocitoză pentru substanțe amorfe, microorganisme, celule, detritusuri celulare etc. (vezi fig. VIII.9). Materiale inhalate (ca asbest) pot fi găsite în macrofagele alveolare din plămâni. Macrofagele alveolare încărcate cu hemosiderină au voaloare de diagnostic în hemoragiile pulmonare idiopatice din hemosideroza idiopatică și sindromul Goodpasture (29). În plămân ele îndepărtează, de asemenea, diverse particule anorganice (componente ale fumului de țigară sau praf inhalat).

Distrugerea celulelor tumorale. Macrofagele sunt capabile *in vitro* să recunoască celule tumorale sau pot fi orientate spre ele cu anticorpi citofili. Citoliza este mediată prin produse de secreție, care cuprind enzime lizosomale, proteinaze citolitice, FNT, peroxizi de hidrogen și radicali de oxigen. Acestea sunt eliberate extracelular după stimularea macrofagelor prin agenți farmacologici sau limfokine, precum și prin FNT. O mare varietate de agenți poate induce activitatea antitumorală, și anume: endotoxina, interferonul gamma, interleukinele, FSC-GM și FSC-M. S-a demonstrat o activitate tumoricidă dependentă de anticorpi în neuroblastom și melanom. În culturi, adăugarea de anticorpi monoclonali murini a dus la o regresie a celulelor de neuroblastom și melanom (4).

Controlul granulopoiezei și eritropoiezei. FSC pentru CFC-GM este secretat de macrofage normale și neoplazice. Studii clinice cu *FSC-G recombinant* au demonstrat că acest factor de creștere hematopoietic poate stimula granulopoieza *in vivo* (13).

Monocitele și macrofagele participă și la reglarea precursorilor eritroizi și secretă un factor de creștere pentru fibroblaști.

Tulburările fagocitelor mononucleare pot fi clasificate în următoarele categorii: monocitoze, monocitopenii, histiocitoze și disfuncțiile ale monocitelor și macrofagelor (25).

Monocitoze. Monocitoza reprezintă creșterea numărului absolut de monocite peste 800/mm^3.

Monocitoza se asociază cu o mare varietate de tulburări și reflectă diferitele mecanisme, prin care poate fi stimulată producția medulară de monocite. Astfel, endotoxinele, antigenele tumorale și complexe imune pot stimula limfocitele T și/sau macrofagele cu producerea de factori stimulatori de colonii (FSC), care favorizează diferențierea monocitelor din precursorii medulari. Aceasta explică monocitoza, care se asociază cu bolile infecțioase, neoplazice și de colagen (25).

Dintre *bolile infecțioase*, în edocardita bacteriană subacută, în sânge se găsește un număr crescut de monocite, unele activate. Ele sunt implicate în fagocitarea complexelor imune. Tuberculoza și histoplasmoza sunt infecții granulomatoase cu diverse grade de monocitoză și infiltrație macrofagică tisulară. Monocitoze mai pot fi întâlnite în listerioză, febră tifoidă și paratifoidă, sifilis, infecții cu fungi și protozoare, convalescența infecțiilor acute.

Dintre *bolile neoplazice*, monocitoza este întâlnită frecvent în diverse neoplazii specifice seriei monocitomacrofagice (leucemii monocitare și mielomonocitare, acute, subacute sau cronice) sau ale altor celule (limfoame maligne, boli mieloproliferative, mielom multiplu) sau boli neoplazice nehematologice (ovar, sân, rinichi, tract gastrointestinal). În bolile mieloproliferative cronice (trombocitemia esențială, policitemia vera și metaplazia mieloidă agnogenică sau postpolicitemică) s-a constatat o extindere a populației de fagocite mononucleare activate și, recent, o creștere a FSC-M (FSC-1) circulant (14). Peste 60% din bolnavii cu neoplazii nehematologice au monocitoză, indiferent de prezența sau absența metastazelor. O monocitoză neexplicată poate ridica suspiciunea unei boli maligne (*„monocitoza premalignă"*).

Dintre *bolile de colagen*, la ~10% din pacienții cu lupus eritematos diseminat se constată o ușoară monocitoză.

Unele boli digestive (sprue, colită ulceroasă, enterită regională, colită granulomatoasă, ciroză) se pot asocia cu monocitoză. În sarcoidoză s-a constatat o creștere locală a numărului de monocite, corelată cu o scădere a numărului de limfocite T supresoare în sângele circulant.

Monocitoza poate fi întâlnită și în diverse *tulburări hematologice nemaligne*. Monocitoza apare în neutropenii cronice și a fost interpretată ca un semn de vindecare în agranulocitoză. În anemiile hemolitice autoimune, în care eritrocitele învelite cu anticorpi sunt distruse de macrofage splenice, se găsește splenomegalie și monocitoză, iar în sânge se pot observa monocite cu eritrofagocitoză.

Monocitoza poate fi întâlnită și în unele reacții medicamentoase.

Monocitopenii. Monocitopenia (monocite <150/mm^3) se întâlnește în stări extrem de diferite, cum sunt aplazia medulară, leucemia cu celule *hairy* și după corticoterapie (25). Monocitopenia contribuie la sensibili-

tatea față de infecțiile cu fungi, mycobacteria și unele microorganisme „oportuniste", față de care monocitele au rol de protecție. La pacienții tratați cu prednison apare o monocitopenie și o diminuare a răspunsului inflamator monocitar, măsurabilă cu metoda ferestrei cutanate.

Histiocitoze. Termenul de histiocitoze se folosește pentru un grup divers de tulburări hematologice, care au la bază proliferarea și activarea macrofagelor (histiocitelor) de către stimuli externi sau anomalii celulare intrinseci (23, 26).

Substratul fiziopatologic al variatelor semne clinice ale histiocitozelor este reprezentat de interacțiunea macrofagelor *„activate"* cu țesuturile normale din jur (16). Dintre acestea menționăm: 1) *formarea granulomului cu celule gigante multinucleate,* prin labilizarea membranei macrofagelor, apariția de zone specializate de aderență, stimularea limfokinelor și fuzionarea macrofagelor; 2) *hemofagocitoza,* care are la bază creșterea activității receptorului Fc pentru IgG prezent pe suprafața celulelor hematopoietice; 3) *leziunile osteolitice,* prin secreție de către macrofage de osteolizine și eliberarea din limfocite a unui factor activator al osteoclastelor; 4) *leziuni dermice,* prin activarea unui subset de macrofage din derm cu caracteristici de celule Langerhans; 5) *febra,* prin pirogenul endogen derivat din macrofage; 6) *artrita distructivă* secundară eliberării de către macrofage de colagenaze și elastaze; 7) *paniculita,* care are la bază colagenazele, elastazele și lipazele secretate de macrofage; 8) *infiltrația eozinofilică a țesuturilor,* prin stimularea de către macrofage a eliberării din limfocite a factorului chemotactic eozinofilic; 9) *disfuncția tubilor renali* prin lizozimurie.

Cunoașterea dezvoltării și funcției fagocitelor mononucleare a permis clasificarea fiziopatologică a sindroamelor histiocitare în: histiocitoze inflamatorii, histiocitoze cu încărcare lipidică și histiocitoze maligne (23).

• *Histiocitozele inflamatorii* pot fi subîmpărțite în două categorii: *histiocitoze cu celule Langerhans* și *histiocitoze cu celule non-Langerhans* (23, 25).

Termenul de *„histiocitoze cu celule Langerhans"* a înlocuit pe acela de *histiocitoză X* (granulomul cu eozinofilie, boala Abt-Letterer-Siwe și sindromul Hand-Schüller-Christian). În cadrul histiocitozelor cu celule Langerhaus se recunoaște existența unor forme localizate și sistemice. Menționăm că încă din anul 1973, Nezelof și colaboratori (27) au adus argumente histogenetice că histiocitele din histiocitoza X au caracteristicile celulelor Langerhans din epiderm. Ulterior, celulele Langerhans au fost diferențiate de alte celule tisulare printr-o serie de markeri ultrastructurali (corpii în rachetă Birbeck), citochimici (esteraza acetat α-naftil, esteraza butirat α-naftil, fosfataza acidă etc.), imunologici (receptori Fc, C_3b, CD1 etc.) și proteinici (lanțul β al neuroproteinei S-100) (23).

• *Histiocitozele cu celule non-Langerhans includ:* histiocitoza hemofagocitică familială, histiocitoza hemofagocitică infecțioasă (virală) și histiocitoza sinusală cu limfadenopatie masivă. Toate aceste denumiri exprimă heterogenitatea aspectului morfopatologic și a tabloului clinic.

• *Histiocitozele cu încărcare lipidică (lipidoze)* sunt tulburări ereditare în care unul sau mai multe țesuturi se încarcă cu lipide. Tipul de lipide și distribuția lui au caracteristici particulare pentru o anumită

entitate. Cele mai cunoscute lipidoze sunt boala Gaucher, în care încărcarea se face cu glucocerebrozide, și boala Niemann-Pick, în care materialul înmagazinat este sfingomielina. Tot din această categorie fac parte gangliozidele și sindromul cu histiocite albastre ca marea.

O încărcare cu lipide a unor macrofage, deosebită de formele descrise mai sus, care merită a fi amintită, este cea observată și considerată caracteristică în leziunile aterosclerotice precoce, în care depozitarea de lipide în macrofage le conferă un aspect spumos (celule spumoase).

• *Histiocitozele maligne* cuprind: *limfomul histiocitar „adevărat"* și *histiocitoza malignă*. Limfomul histiocitar „adevărat", definit prin metode histiochimice și imunologice, este relativ rar. Termenul de histiocitoză malignă a fost introdus în 1966 de Rappaport pentru o entitate caracterizată prin proliferarea progresivă, invazivă, neoplazică a histiocitelor.

Disfuncții ale monocitelor și macrofagelor. În această grupă un loc bine delimitat este reprezentat de *osteopetroză* (*osteitis condensas* generalizată; boala Albers-Schönberg). Osteopetroza este tipul de deficit izolat al osteoclastelor, cu diminuarea resorbției osoase și formarea „oaselor de marmură". O serie de studii au demonstrat că osteopetroza poate fi vindecată prin transplantare de măduvă osoasă (7, 32). Aceste rezultate confirmă originea medulară a osteoclastelor.

În unele afecțiuni din această grupă, anomaliile interesează în afară de fagocitele mononucleare și granulocitele, ca în boala granulomatoasă cronică și sindromul Chediak-Higashi. Boala granulomatoasă cronică are la bază un deficit dependent de oxigen în distrugerea germenilor microbieni. Boala Chediak-Higashi rezultă din anomalii ale granulațiilor din citoplasma celulelor sanguine („boala lizosomală") (incluziuni cu diametru de 1—5 μm).

Tot în grupa disfuncțiilor fagocitelor mononucleare au fost incluse candidioza mucocutanată diseminată, terapia cu glucocorticoizi și tabagismul.

În ceea ce privește perspectivele de terapie, recent, s-a dovedit că FSC-GM, obținut în cantități mari prin *tehnologie recombinantă* (*„molgramostim"*) influențează diferențierea și funcția fagocitelor mononucleare. Acest medicament (*„Leucomax"*) este în experimentare clinică pentru un spectru larg de efecte potențiale (antiinfecțioase, antitumorale, corectarea defectelor stromale, creșterea răspunsului imun etc.) (12).

BIBLIOGRAFIE

1. BERCEANU ȘT., GOCIU M., GROZEA P.: Sistemul reticuloendotelial. Edit. Medicală, București, 1967.
2. BESSIS M., BRECHER G.: Blood spears reinterpreted. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1977, 157.
3. BRODY A. R., CRAIGHEAD J. E.: Lab. Invest 1975; 32: 125.
4. CHOUNG N. K. și colab.: J. Clin. Oncol. 1987; 5: 1430.
5. CLARK S. C., KAMEN R.: Science 1987; 236: 1229.
6. CLINE M. J. și colab.: Ann. Intern. Med. 1978; 88: 78.
7. COOCIA P. F. și colab.: N. Engl. J. Med. 1980; 302: 701.
8. DOUGLAS S. D., HASSAN N. F.: În Williams V. J. și colab. (eds.): Hematology, ed. a IV-a: McGraw-Hill Publ. Co., New York, 1990, 859.

9. EMERSON S. G.: În HOFFMAN R. şi colab. (eds.): Hematology. Edit. Churchill Livingstone Inc., New York, 1991, 77.
10. FURTH R. VAN, COHN Z. A.: J. Exp. Med. 1968; 128: 415.
11. FURTH R. van: Bull. Wld. Org. 1972; 46: 685.
12. FURTH R. van: Haematopoietic growth factors and mononuclear phagocytes, International Congres, Lugano, May 4—5, 1992.
13. GABRILOVE J. L. şi colab.: N. Engl. J. Med. 1988; 388: 1414.
14. GILBERT H. S. şi colab.: Blood 1989; 74 (4): 1231.
15. GOLDE D. W., GROOPMAN J. E.: În Williams W. J. şi colab. (eds.): Hematology, ed. a IV-a. McGraw-Hill Publ. Co., New York, 1990, 874.
16. GROOPMAN J. E., GOLDE D. W.: Ann. Intern. Med. 1981; 94: 95.
17. GROOPMAN J. E., GOLDE D. W.: În WILLIAMS W. J. şi colab. (eds.): Hematology, ed. a IV-a. McGraw-Hill Publ. Co., New York, 1990, 869.
18. HICKEY W. F., KIMURA H.: Science 1988; 239: 290.
19. HOEFSMIT E. C. M. şi colab.: Immunobiology 1982; 161: 255.
20. HUGHES R. A. C.: J. Roy. Soc. Med. 1992; 85 (1): 53.
21. JOHNSTON R. B. Jr., ZUCKER-FRANKLIN D.: În Zucker-Franklin D. şi colab. (eds.): Atlas of blood cells Edit. Ennes, Milano, 1988, 321.
22. KATZ S. J., TANAKI K., SACHS D. H.: Nature 1979; 282: 324.
23. KOMP D. M., LICHTMAN M. A.: În Williams W. J. şi colab. (eds.): Hematology, ed. a IV-a, McGraw-Hill Publ. Co., New York, 1990, 895.
24. LEVY J. A.: Nature 1988; 333: 519.
25. LICHTMAN M. A.: În WILLIAMS W. J. şi colab. (eds.): Hematology, ed. a IV-a, McGraw-Hill Publ. Co., New York, 1990, 882 şi 879.
26. LIPTON J. M.: În Hoffman R. şi colab. (eds.): Hematology. Edit. Churchill Livingstone, New York, 1991, 604.
27. NEZELOF C. şi colab.: Biomedicine 1973; 18: 365.
28. NICHOLS B. şi colab.: J. Cell. Biol. 1971; 50: 498.
29. SEGEL G. B., COHEN H. J.: În Hoffman R. şi colab (eds.): Hematology. Edit. Churchill Livingstone, New York, 1991, 535.
30. SHERR C. J. şi colab.: Cell 1985; 41: 665.
31. TAKEMURA R., WERB Z.: Am. J. Physiol. 1984; 246: C_1—C_9.
32. WALKER D. G.: J. Exp. Med. 1975; 142: 651.
33. WOLF P. V.: În Bick R. L. (ed.): Hematology. Edit. Mosby, St. Louis, 1993, 577.
34. WOLKMAN A., GOWANS J. L.: Brit. J. Exp. Path. 1965; 46: 62.

IX

SERIA MEGACARIOCITOTROMBOCITARĂ

ADRIANA COLIȚĂ

Definiție. Megacariocitele sunt celule poliploide medulare înzestrate cu proprietatea de endocitoză și cu capacitatea de a secreta printr-un mecanism de tip apocrin trombocitele din sânge (planșa a IV-a). Trombocitele sunt fragmente citoplasmatice anucleate de megacariocite cu capacitatea unică de a adera la pereții vaselor sanguine lezate și de a forma agregate celulare. Aceste proprietăți stau la baza rolului important pe care îl au în hemostază. Trombocitele asigură *hemostaza primară* prin formarea dopului hemostatic care oprește inițial sângerarea. Ele furnizează *o suprafață* pentru asamblarea moleculară a proteinelor coagulării, care duce la generarea trombinei și formarea fibrinei, stabilizând dopul hemostatic. Trombocitele mențin „integritatea" endoteliului vascular.

Patologia trombocitelor cuprinde nu numai sidroamele hemoragice și trombozele, ci și alte procese, cum sunt: ateroscleroza, leziunile mediate imun, vasospasmul, fagocitoza și posibil metastazarea tumorilor maligne.

Istoric. Trombocitele au fost semnalate pentru prima oară la începutului secolului al XIX-lea dar au fost considerate fragmente de eritrocite sau leucocite. În 1874, Hayem a recunoscut tendința trombocitelor de a forma agregate și a sugerat că ele joacă un rol în hemostază. În 1882, G. Bizzozero a stabilit definitiv că trombocitele sunt entități morfologice distincte, care circulă în sânge și formează trombusul alb. În 1906, J. H. Wright a observat că megacariocitele localizate extravascular produc prelungiri citoplasmatice care penetrează în compartimentul intravascular al măduvei osoase, unde suferă fragmentarea în trombocite. Originea trombocitului, controversată ani de zile, a fost elucidată prin dovedirea similarității antigenice și în compoziția chimică a megacariocitului și trombocitului (21, 22, 40) și prin microcinematografia directă pe celule vii (32).

În ultima decadă, studiile intense asupra funcțiilor trombocitelor au dus la descoperiri majore privind prostaglandinele, la cunoașterea contracției mușchiului neted, iar captarea unor bioamine, ca serotonia, și detectarea enolazei γγ (enzimă neuronală specifică) au sugerat încadrarea trombocitelor în „sistemul neuroendocrin difuz" (36).

Evoluția filogenetică și ontogeneza. Omul și vertebratele superioare au un mecanism hemostatic complex în care intervin, pe lângă trombocite și endoteliile vasculare, și proteinele de coagulare din sânge. La animalele inferioare, mecanismul hemostatic este mai simplu. Astfel, unele nevertebrate *(Limulus polyphaens)* posedă o celulă sanguină cu funcție de fagocit și trombocit (denumit amebocit). Această celulă are capacitatea de a adera la particule străine și de a forma agregate celulare. Ea secretă, de asemenea, o proteină coagulabilă similară cu fibrinogenul de la mamifere. La vertebrate inferioare (pești, amfibii, reptile, păsări), echivalentul funcțional al planchetelor sunt trombocitele nucleate, care provin din diviziunea succesivă a celulelor precursoare, „tromboblaștii", într-o manieră similară formării eritrocitelor din eritroblaști (23). Sistemul megacariocit-trombocit a apărut în cursul evoluției la mamifere. Evoluția speciilor a lucrat în sens economic în ceea ce privește formarea trombocitelor. Sistemul tromboblast-trombocit prin diviziune directă poate produce cel mult 64 de trombocite, pe când megacariocitele, celule poliploide, pot produce între 4 000 și 8 000 de trombocite.

CICLUL DE VIAȚĂ

Origine. Studiul biologiei megacariocitelor a fost dominat mult timp de *aspectele morfologice* ale celulelor umane fixate și ale celor obținute de la animale. În ultima decadă, situația s-a schimbat radical prin dezvoltarea metodelor care permit: 1) clonarea progenitorilor megacariocitari *in vitro;* 2) purificarea aproape completă a populațiilor de megacariocite umane; 3) obținerea de factori de stimulare a coloniilor prin tehnologia ADN recombinant și probe de ADNc specific plachetare (15).

Ca și celelalte celule hematopoietice din măduva osoasă, megacariocitele au originea în celulele stem pluripotente (CSP). De la nivelul CSP, megacariopoieza apare ca un proces continuu care traversează *două mari compartimente:* 1) *compartimentul de progenitori;* 2) *compartimentul de megacariocite.*

Primul compartiment este de proliferare. Progenitorii sunt de trei tipuri după: proprietățile fizice, tipul de colonii, timpul de dezvoltare în cultură. Aceste trei tipuri sunt: 1) unitatea formatoare de colonii megacariocitare de tip „exploziv" *(burst)* (BFU-MK); 2) unitatea formatoare de colonii megacariocitare (CFU-MK); 3) unitatea formatoare de colonii de densitate mică *(„light density")* (LD-CFU-MK).

Al doilea compartiment este format din descendenții imediați ai celulelor progenitoare cunoscuți ca megacarioblaști și din megacariocitele care pot fi recunoscute la microscopul optic. Calea de maturație a liniei megacariocitotrombocitare este ilustrată în fig. IX.1.

BFU-MK prezintă aceiași markeri imunologici ca și celelalte celule progenitoare medulare. *CFU-MK* își confirmă dezvoltarea spre linia megacariocitară prin prezența glicoproteinei IIb—IIIa (GPIIb—IIIa). Între

celulele progenitoare și megacariocitele identificabile morfologic există un *stadiu tranzițional* reprezentat de o celulă mononucleară mică. Aceasta nu poate fi recunoscută ca megacariocit la microscopul optic, dar exprimă markeri fenotipici specifici pentru linia megacariocitară: glicoproteine (GPIb, GPIIb—IIIa), factorul von Willebrand (FvW), trombospondina

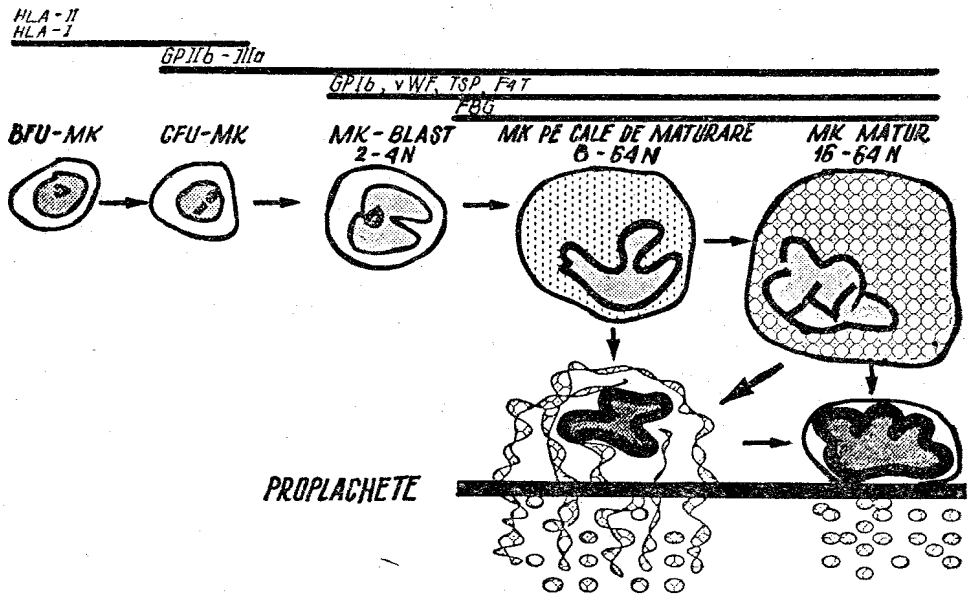


Fig. IX.1. — Calea de maturație a liniei megacariocitotrombocitare (după W. M. Isenberg, D. F. Bainton, 1991).

(TSP), factorul 4 trombocitar (F_4T), peroxidaza plachetară (POP). Celula a fost numită *„promegacarioblast"* și este echivalentul uman al megacarioblastului acetilcolinesterază pozitiv de la șoarece (5). Promegacarioblastul își oprește proliferarea mitotică și începe poliploidizarea; sicron cu poliploidizarea apar markerii fenotipici plachetari. Numărul promegacarioblaștilor crește odată cu creșterea masei megacariocitare și scade odată cu scăderea masei megacariocitare.

Celule mici tranziționale ajung să fie recunoscute la microscopul optic ca megacariocite prin creșterea poliploidiei lor și prin maturația citoplasmei.

Megacariocitele trec prin *patru stadii de maturație:* megacarioblast, megacariocit în curs de maturație, megacariocit matur și megacariocit trombocitogen. Delimitarea acestor stadii s-a făcut arbitrar, după criterii morfologice: configurația și mărimea nucleului, raportul N/C, culoarea și granulațiile citoplasmei. Timpul de maturare al megacariocitelor la om este în jur de 10 zile. Secvența dezvoltării de la megacariocit la trombocite duce de la proliferarea progenitorilor la poliploidizare și în final la maturația citoplasmei și formarea de trombocite.

Endoreplicarea nucleară și poliploidizarea. Faza inițială a megacariocitopoiezei se caracterizează prin proliferarea progenitorilor, care se face prin diviziuni mitotice. Această fază de proliferare este urmată de oprirea diviziunilor mitotice și continuată de endoreplicarea nucleară. Fenomenul de endoreplicare care duce la apariția de celule poliploide este întâlnit numai la seria megacariocitară. Procesul de endoreplicare nucleară are loc în stadiul de megacarioblast. ADN suferă un proces repetat de endoreplicare fără diviziunea nucleului. Nucleul crește în dimensiuni și suferă o lobulație marcată. Poliploidia nucleului poate fi de 4, 8, 16, 32 sau 64N. Celulele sunt recunoscute morfologic ca megacariocite când valoarea poliploidiei este >8N. Stabilirea poliploidiei se face numai prin măsurarea cantității de ADN sau numărarea cromosomilor. Gradul lobulației nu este egal cu gradul poliploidiei; 2/3 din megacariocite sunt 16N, 1/4 — 32N și restul 8N. Concomitent cu replicarea ADN crește masa citoplasmatică. Mărimea celulei normale se corelează cu ploidia ei, celulele cu ploidie scăzută fiind mai mici decât cele cu ploidie mare. Numărul de trombocite produs de un megacariocit este legat în raport direct cu volumul său citoplasmatic. Poliploidizarea este un mijloc de amplificare a producției de trombocite prin variația volumului citoplasmatic (29).

Maturația citoplasmei. După 2—3 cicluri endomitotice, celula își oprește creșterea și începe procesul de maturație al citoplasmei. Sinteza organitelor specifice începe timpuriu, dar se accentuează după terminarea endomitozei. Maturația citoplasmei se traduce morfologic prin apariția organitelor specifice liniei megacariocitotrombocitare: granulele α, corpii denși și sistemul de demarcare de membrană (SDM). Granulele α au fost identificate din stadiile timpurii ale megacariopoiezei. În granulele α au fost identificate: TSP, F4T, β-tromboglobulină (β-TG), FvW. În stadiile mature se detectează fibrinogen. Megacariocitele au proprietatea de a endocita proteine din plasmă printre care și fibrinogenul, pe care îl înmagazinează în granulele α. Corpii denși înmagazinează serotonină din sânge și depozitează nucleotide sintetizate în megacariocit. Membranele de demarcație formează o rețea de canale interne care delimitează în citoplasmă granițele viitoarelor trombocite. Când maturația este completă, toată citoplasma megacariocitului este fragmentată și apare trombocitopoieza. Nucleul liber de megacariocit este fagocitat de macrofage. Două aspecte ale producției de trombocite rămân controversate: mecanismele trombocitopoiezei și locul producției de trombocite.

Trombocitopoieza. S-au formulat două teorii cu privire la trombocitopoieză și eliberarea trombocitelor în sânge (1, 27). Distincția majoră dintre cele două teorii se bazează pe originea sistemului membranelor de demarcație și a rolului lui în formarea trombocitelor. După *modelul proplachetar,* SMD organizează citoplasma megacariocitului în domenii trombocitare distincte. Când un megacariocit emite un pseudopod în sinusurile capilare, acesta se fragmentează de-a lungul planurilor de clivaj stabilite de SMD, eliberând fragmente de mărime variabilă din citoplasma megacariocitelor (proplachete) în circulație (31). Aceste fragmente se împart de-a lungul SMD în plachete individuale. După *modelul flow* se consideră că SMD reprezintă o formă de depozitare a membranei plasmatice megacariocitare care este *în exces* și se inva-

ginează. Această membrană în exces poate fi eliminată din megacariocit formând un pseudopod în timpul procesului de eliberare de trombocite. Forțele de forfecare induse de fluxul din sinusurile capilare ar duce la apariția de constricții în pseudopode și eliberarea trombocitelor. S-a demonstrat că pe măsura formării pseudopodelor scade SMD. În plus, expunerea megacariocitelor la Vincristin duce la retragerea proceselor megacariocitare și la reapariția SMD. Alți autori (41, 42) consideră că SMD derivă numai parțial din membrana plasmatică megacariocitară. Trombocitele s-ar forma numai prin fragmentare în interiorul megacariocitului, iar zona periferică nu ar fi implicată în acest proces.

Locul de producție. Un număr de cercetători susțin că trombocitopoieza apare nu numai în măduva osoasă, ci și în plămâni (30). În sprijinul acestei teorii vine găsirea megacariocitelor în sângele periferic și faptul că numărul lor este mai mare în artera pulmonară decât în vena pulmonară. S-a emis ipoteza că heterogenicitatea trombocitelor se datorează fragmentării citoplasmei proplachetare în microcirculația pulmonară.

Numărul de megacariocite din măduva osoasă este de 6×10^6 megacariocite/kg greutate corporală. Timpul de maturație al megacariocitelor la om este de 4—5 zile. Numărul de trombocite eliberat de fiecare megacariocit este între 1 000 și 8 000 de trombocite. Producția de trombocite (estimată din *turnover*-ul trombocitar) este de 40 000/µl/24 h.

Distribuția trombocitelor. Concentrația trombocitelor din sânge este de 250 000/µl, cu limite între 150 000 și 400 000/µl. La normal, 2/3 din trombocite se găsesc în circulația generală și 1/3 sunt sechestrate în splină, care servește ca un rezervor de trombocite; între cele două compartimente se produc schimburi continue. La subiecții asplenici 100% din trombocitele marcate (cu ^{51}Cr sau ^{111}In) se găsesc în circulație. La cei cu splenomegalie procentul sechestrării poate să crească până la 90%. Rolul splinei în sechestrarea trombocitelor este confirmat și de creșterea numărului lor după splenectomie. Trombocitele traversează splina mult mai încet decât eritrocitele și granulocitele. Proprietățile adezive ale trombocitelor joacă un rol în încetinirea trecerii prin splină. Splina conține un număr mai mare de trombocite mari și trombocite tinere decât sângele. Trombocitele nou formate ajung în splină, unde rămân 8 ore, după care reintră în circulație („compartiment trombocitar neinterșanjabil") (23).

Heterogenicitatea trombocitelor. Trombocitele circulante sunt heterogene în ceea ce privește mărimea și densitatea. Heterogenicitatea în mărime și densitate depinde de mărimea și ploidia megacariocitelor și de stresul trombopoietic. Heterogenicitatea este manifestă în momentul formării trombocitelor și reflectă tipul de megacariocit (8N, 16N, 32N) care le produce. În cursul supraviețuirii în circulație, mărimea și densitatea trombocitelor scad. Aceasta reflectă pierderea de membrane celulare și de granule α datorită ciclurilor repetate de agregare și dezagregare în circulație. Spre deosebire de megacariocite, trombocitele nu pot sintetiza proteine și nu pot să-și refacă membranele și granulele. Trombocitele tinere sunt mari, cu mai multe granule și sunt hemostatic mai active decât trombocitele bătrâne. În situațiile cu distrucție trombocitară rapidă (și producție trombocitară rapidă), cum se produce în purpura trombocitopenică idiopatică (PTI), un număr scăzut de trombocite

poate menține o hemostază aproape normală, fiindcă *megatrombocitele* sunt tinere, mari și active în hemostază (12, 15).

La normal, numărul de trombocite și volumul trombocitar mediu (VTM) sunt reglate direct în cursul producției de trombocite. Numărul total de trombocite din sânge se corelează direct cu numărul de megacariocite și gradul ploidiei lor, iar VTM se corelează direct cu volumul megacariocitar. În condiții de *stress trombopoietic* se produce o creștere a VTM. Această creștere apare în câteva ore și este dată de mobilizarea trombocitelor de dimensiuni mari din splină și de creșterea dimensiunilor megacariocitelor. După un interval de 24—48 de ore se produce o creștere în numărul și ploidia megacariocitelor din măduvă, care se asociază cu o creștere a numărului de trombocite. Menținerea constantă a masei trombocitare totale (MTT), care este produsul între numărul de trombocite din sânge și volumul trombocitar mediu, cere un mecanism de reglare care poate detecta atât trombocitele circulante, cât și cele sechestrate. Un factor reglator al producției de trombocite este prezent în trombocite și eliberat în cursul distrucției lor.

Durata de viață a trombocitelor la om, determinată prin marcarea cu ^{51}Cr, ^{32}DFP (diizopropilfluorofosfat) sau ^{111}In (indium) este de 8—12 zile. Factorii implicați în determinarea duratei de viață nu sunt cunoscuți în întregime. S-au descris două modele de distrucție trombocitară: a) *liniar*, care indică faptul că trombocitele îmbătrânesc în circulație și se distrug când au ajuns la sfârșitul duratei lor de viață; b) *„stocastic"*, care indică faptul că un număr fix de trombocite este utilizat zilnic (15). S-a demonstrat o pierdere constantă de $7—10 \times 10^9$ trombocite/μl/zi. Această utilizare fixă este aceeași pentru subiecți normali sau trombocitopenici. Studii autoradiografice la cobai trombocitopenici perfuzați cu trombocite marcate cu ^{3}H-DFP au demonstrat aderarea trombocitelor și „încorporarea" lor în celule endoteliale. Trombocitele mențin integritatea vasculară prin fuziunea cu endoteliul (11). Majoritatea trombocitelor este îndepărtată din circulație la sfârșitul duratei lor de viață de macrofage din splină, ficat și măduva osoasă. Prezența în circulație de fragmente mici de trombocite („praf plachetar") sugerează un proces de autodistrucție în circulație. Studiile izotopice de kinetică a trombocitelor a dus la înțelegerea fiziopatologiei trombocitopeniilor prin tulburare de producție și distrucție crescută. Determinarea ariilor de sechestrare a trombocitelor marcate cu ^{51}Cr nu a crescut valoarea predictivă a beneficiului splenectomiei.

Reglarea megacariocitopoiezei. Ca orice sistem celular proliferativ, reglarea megacariocitopoiezei se face prin interacțiunea între factorii stimulatori și cei inhibitori (fig. IX.2) (14, 15).

S-au făcut un număr mare de studii *in vitro* și *in vivo* cu citokine purificate și recombinante. Unele din citokine au o *acțiune de stimulare* a coloniilor megacariocitare, cum este MK-CSA *(megakaryocit colony stimulating activity)*, în timp ce altele acționează sinergic cu alți factori care influențează proliferarea CFU-MK. În mijlocul figurii IX.2 este ilustrată megacariocitopoieza de la CFU-MK la trombocit, cu notarea în partea inferioară a factorilor stimulatori, iar în partea superioară a factorilor inhibitori.

Factorii stimulatori: IL-3, GM-CSF şi Meg-CSA *(megacaryocit colony stimulating activity)* au efect predominant asupra *progenitorilor megacariocitari,* deşi pot să influenţeze şi maturaţia celulară.

Factorii sinergici: IL-1 şi G-CSF nu au acţiune directă, ci sinergică cu a factorilor stimulatori. Factorul celulei stem (FCS) accentuează proliferarea megacariocitelor în combinaţie cu alte citokine.

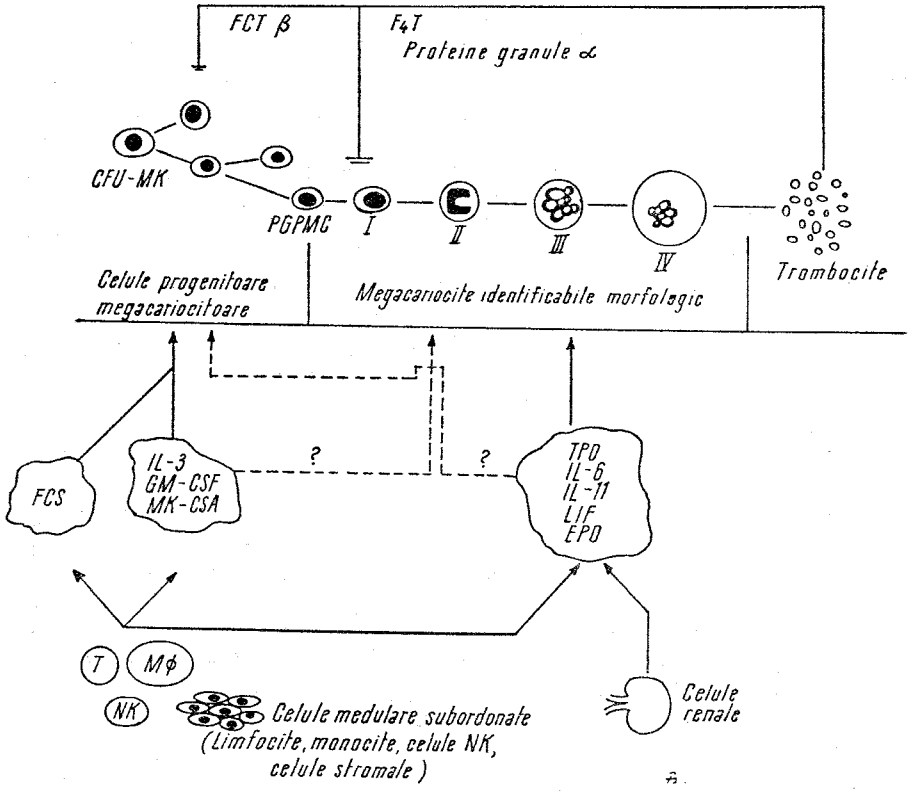


Fig. IX.2. — Reglarea megacariocitopoiezei (după W. M. Isenberg; D. F. Bainton, 1991).

Maturaţia şi probabil şi *producerea megacariocitelor* este realizată de *trombopoietină (TPO),* factor hormonal specific pentru linia megacariocitară recent identificată, purificată şi clonată (30 a). Purificarea TPO promite a fi un progres important în tratamentul trombocitopeniilor şi în reducerea nevoii de transfuzii de trombocite.

Un *grup de alte citokine,* ca IL-6, LIF *(leukemia inhibitory factor),* IL-11, oncostatin M, are *activitate de maturaţie a megacariocitelor.*

Eritropoietina (EPO) promovează maturaţia megacariocitelor şi are efect şi asupra proliferării progenitorilor (14). Megacariocitele au receptori pentru eritropoietină. IL-1 activează maturaţia megacariocitelor prin creşterea IL-6.

Condiţiile clinice incluzând anemia severă, inflamaţia cronică sau infecţia în care se elaborează astfel de citokine sunt frecvent asociate cu trombocitoză.

Sursele principale ale acestor factori sunt: limfocitele T, monocitele (Mo), celulele NK, celulele stromale şi celulele renale.

Au fost descrişi *factori inhibitori* ai megacariocitopoiezei, cum sunt: TGF-β *(transforming growth factor* β*)* şi PF4 *(platelet factor* 4*)*.

TGF-β se găseşte în concentraţii relativ mari în trombocit, iar PF4 este un constituent al granulelor α din megacariocite şi trombocite care inhibă formarea coloniilor megacariocitare.

Efecte inhibitorii asupra megacariopoiezei au şi interferonul şi IL-4.

Masa megacariocitară şi trombocitară are un rol important în procesul de reglare al megacariocitopoiezei. Scăderea acestei mase stimulează producţia reglatorilor trofici şi scade inhibitorii; invers, creşterea acestei mase inhibă producţia reglatorilor trofici şi poate duce la creşterea nivelurilor inhibitorilor.

STRUCTURA

Megacariocitele reprezintă o fracţiune minoră din celulele hematopoietice ale măduvei osoase (~0,05% din celulele nucleate ale măduvei). Datorită taliei mari (diametrul variind între 30 şi 100 μm sunt uşor de recunoscut pe frotiurile de măduvă osoasă. Pe baza studiilor complexe de microscopie optică, microscopie electronică şi a markerilor de linie s-au schematizat *patru stadii de maturaţie:* megacarioblast, megacariocit bazofil, megacariocit matur, megacariocit care produce trombocite.

Megacarioblastul (megacariocitul stadiul I) are un diametru de 30—40 μm. Conturul celulei seamănă cu un patrulater. Nucleul este mare, de formă trapezoidă sau ovală, nelobat şi neincizat, cu o reţea cromatiniană groasă, cu câţiva nucleoli. Valoarea poliploidiei nucleului variază între 8 şi 32N. Citoplasma este albastră, în cantitate redusă, uneori cu prelungiri. Raportul nucleu/citoplasmă este de 10/1.

Promegacariocitul sau megacariocitul bazofil (megacariocit stadiul II) are 40—50 μm în diametru. Nucleul este incizat, cu cromatină densă. Nu se mai văd nucleoli. Citoplasma în cantitate mai mare este bazofilă. Lângă nucleu se găseşte o zonă necolorată ce corespunde aparatului Golgi în jurul căreia apar granulaţii fine azurofile.

Megacariocitul granular (megacariocit stadiul III sau matur) are 50—100 μm în diametru. Indiferent de gradul poliploidiei, nucleul este polilobat. Citoplasma abundentă este acidofilă şi conţine numeroase granulaţii azurofile (granule α).

Megacariocitele pot fi uneori confundate cu alte celule gigante normal prezente în măduvă în număr mic (osteoclaşti, osteoblaşti, celule reticulare) sau cu celule patologice (eritroblaşti multinucleaţi, plasmocite multinucleate, celule tumorale, celule Reead-Sternberg, celule de tezaurizare).

Aspecte mai particulare ale megacariocitelor au fost semnalate în diferite afecțiuni. Megacariocite cu nucleu hiperlobulat („în explozie") și cromatină nucleară fină au fost descrise în deficiența de vitamină B_{12} și acid folic. Megacariocite mici cu unul sau doi nuclei mici și citoplasmă granulară abundentă au fost observate în leucemia granulocitară cronică (LGC) sau în sindromul mielodisplazic. Micromegacariocite bazofile cu citoplasmă puțină („pitice") și zone cu trombocite au fost întâlnite în metamorfozarea blastică a LGC.

Citochimie. Megacariocitele sunt negative la examinările în microscopie optică pentru peroxidaze, Sudan black, naftol AS-D, cloracetat esterază și α-naftol butirat esterază. Ele sunt pozitive pentru periodic-acid Schiff (PAS) și fosfatază acidă. Ele sunt, de asemenea, pozitive pentru α-naftil acetat, reacție inhibată de fluorura de sodiu.

Aspecte ultrastructurale. Analiza ultrastructurală a adus date de arhitectură subcelulară importante pentru înțelegerea fiziologiei megacariocitului și a procesului de formare a trombocitelor.

Maturația *nucleului* se caracterizează prin lobulația crescută și condensarea cromatinei. Gradul lobulației este proporțional cu poliploidia, dar un lob nuclear nu are valoare de 2N. Studiile de microscopie electronică combinate cu dozări microfotometrice ale ADN și autoradiografie după marcarea cu timidină tritiată au stabilit că megacariocitele în faza de replicare a ADN au început sinteza organitelor lor specifice. Acest proces se accentuează după terminarea endomitozei.

Maturația *citoplasmei* se traduce prin apariția de granule, vezicule și membrane de demarcație cu reducerea concomitentă a ribosomilor (liberi sau atașați de membrane) și elaborarea în stadiu final a trombocitelor. Convențional, citoplasma megacariocitului a fost divizată în *trei zone: perinucleară, intermediară* și *marginală. Zona perinucleară* conține aparatul Golgi cu veziculele asociate, granule pe cale de formare, reticulul endoplasmatic granular (RER) și neted (REN), centrioli și tubulii fusului mitotic. În celule tinere, RER este abundent și există numeroși ribosomi. În celulele mature este foarte dezvoltat REN, care apare adesea strâns legat cu membranele de demarcație. Evidențierea în REN a peroxidazei plachetare a permis stabilirea originii sistemului tubular dens al trombocitului. Aparatul Golgi este situat în concavitatea nucleului și la nivelul lui s-au evidențiat proteine ale granulelor α, ale lizozomilor și glicoproteine ale membranei plachetare.

Originea *granulelor* α este mai puțin clară. Ele au fost descrise în toate stadiile de maturație ale megacariocitelor și conțin proteine derivate din sinteză endogenă (TSP, F4T, βTG, FvW) și proteine captate prin endocitoză din plasmă (fibrinogen, imunoglobuline, albumină). Matricea lor prezintă o arie opacă numită nucleotid. Proteinele sunt stocate în porțiunea clară și respectă nucleotidul. FvW este distribuit excentric și asociat cu structuri tubulare. Granulele α sunt cele mai mari și mai numeroase granule din megacariocit.

Corpii denși sun mici, puțini și apar în megacariocitul matur. Ei conțin, depozitate, serotonină captată din sânge, calciu și nucleotide.

Lizosomii conțin fosfatază acidă, arilsulfatază, catepsină D sintetizate în megacariocit și depozitate într-o populație de granule distincte de granulele α.

Zona perinucleară rămâne atașată la nucleul denudat după eliberarea trombocitelor.

Zona intermediară conține *sistemul de membrane de demarcare* (SMD), care reprezintă o structură caracteristică megacariocitului. SMD apare ca un sistem interconectat de vezicule și tuburi care delimitează teritoriile viitoarelor trombocite și formează sistemul de legătură cu suprafața în trombocit. SMD se află în continuitate cu spațiul extracelular și are domenii care diferă în încărcătura de suprafață și structură. Structura sa complexă sugerează origini multiple. O parte este format prin invaginarea membranei plasmatice a megacariocitului. O altă contribuție la formarea SMD o are fuziunea între vezicule și vacuole în regiunea complexului Golgi. La nivelul lui au fost evidențiate glicoproteine ale membranei trombocitare (GP IIb/IIIa, GP Ib). SMD delimitează teritoriile plachetare sau servește ca rezerve de membrană în momentul formării pseudopodelor care duc la eliberarea trombocitelor.

Uneori, în citoplasma megacariocitelor se pot observa, în membranele de demarcație dilatate, una sau mai multe celule intacte din măduvă: eritroblaști, granulocite, limfocite. Prezența unei celule în interiorul altei celule, fără ca vreuna din ele să fie lezată, se numește *emperipoleză*. Celulele au alunecat pe canalele SMD care comunică cu exteriorul.

Zona periferică conține filamente care, la analiza imunohistochimică, s-a constatat că sunt formate din proteine contractile (actină, miozină). Microtuburile sunt identificate în axul mare al pseudopodelor pe care le emit megacariocitele în momentul eliberării trombocitelor și concentrate la nivelul strangulărilor lor.

MARKERI AI MEGACARIOCITELOR

Peroxidaza plachetară (POP) este constantă și caracteristică pentru linia megacariocitară (5, 10), deși recent a fost descrisă și în precursorii eritrocitari (CFU-E). Apare timpuriu în maturație, în blaști cu talie și morfologie de limfocit și este prezentă exclusiv în cisterna perinucleară și reticulul endoplasmatic. Ea este evidențiată în sistemul tubular dens al trombocitului. Funcția sa este legată de metabolismul prostaglandinelor. POP a permis identificarea leucemiei acute cu megacarioblaști (M_7 în clasificarea FAB) și a micromegacariocitelor „pitice" din sânge în bolile mieloproliferative cronice.

Acetilcolinesteraza este marker pentru megacariocite în toate stadiile de maturație la rozătoare.

Anticorpi monoclonali. Megacariocitele pot fi marcate prin utilizarea de anticorpi specifici care recunosc anumite glicoproteine ale membranei plachetare (sau proteine intracitoplasmatice). S-au putut preciza, datorită studiilor făcute pe progenitori megacariocitari în cultură (CFU-MK), secvențe de apariție a acestor markeri. Complexul GP IIb și IIIa apare primul pe suprafața CFU-MK, urmat de GP Ib. Markerii citoplasmatici (FvW, trombospondina) apar simultan cu GP Ib în celu-

lele imature. Fibrinogenul apare mai tardiv. Markerii citoplasmatici pot fi detectați în imunofluorescență sau ultrastructural prin imunomarcaj cu aur coloidal.

Trombocitul apare la microscopul optic ca un fragment de citoplasmă fără nucleu, cu diametrul de 2,5 μm și volum de 7,8 μm^3. El conține două porțiuni: hialomerul (zona periferică hialină) și granulomerul (zona centrală granulată). Trombocitele circulante constituie o populație heterogenă atât în ceea ce privește proprietățile fizice (volum, densitate), cât și proprietățile metabolice, biochimice, hemostatice. Megatrombocite (cu diametrul > 2,5 μm și cu volum > 13 μm^3), cu numeroase granulații, apar în număr crescut în cazul unei trombocitopoieze stimulate (ca urmare a unei distrucții trombocitare accelerate prin mecanism imun sau prin consum) (12). Megatrombocite au fost găsite și în trombocitopenii ereditare (macrotrombocitoza mediteraneană, anomalia May Hegglin, sindromul Alport etc.). Trombocite mari cu forme „bizare", adesea fără granulații, au fost descrise în sindromul mielodisplazic și în boli mieloproliferative cronice (24).

Ultrastructura trombocitului (fig. IX.3) poate fi împărțită schematic în patru compartimente diferite: zona periferică, zona sol-gel, zona organitelor și sistemul de membrane.

Zona periferică este o regiune complexă a trombocitului și este compusă dintr-un înveliș exterior amorf (glicocalix), membrană plasmatică, o arie submembranoasă cu microfilamente (fig. IX.4).

Glicocalixul este bogat în glicoproteine care servesc ca *receptori* sau sunt antigene. Trombocitele prezintă antigene de grup sanguin (ABO), antigene de histocompatibilitate (HLA clasa a II-a) și un receptor pentru porțiunea Fc a imunoglobulinei G, cu rol în trombocitopeniile produse de medicamente. Doi receptori plachetari: glicoproteina Ib (GP Ib) și complexul glicoproteină IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) au fost intens studiați. *Glicoproteina Ib (GP Ib)* este un heterodimer compus din două subunități: (GP Iba) (GM: 145 000) și GP Ibb (GM: 22 000) unite prin legături disulfid. Subunitatea grea (GP Iba) este sensibilă la proteoliză și un fragment mare (glicocalicin) poate fi detectat în plasma unor bolnavi cu trombocitopenii imune. GP Ib se asociază cu alte două glicoproteine de membrană (GP IX și GP V) și formează receptorul pentru FvW. Legarea FvW la complexul GP Ib IX este importantă pentru inițierea aderiunii la subendoteliu. GP Ib IX lipsește de pe trombocitele pacienților cu sindrom Bernard-Soulier.

Complexul *glicoproteina IIb/IIIa* este un heterodimer și face parte din familia de integrine a receptorilor proteici de adeziune de pe suprafața membranelor celulare. GP IIb/IIIa apare numai pe trombocit și megacariocit. Complexul este constituit din două subunități: GP IIb (GM: 140 000) și GP IIIa (GM: 95 000). Complexul GP IIb/IIIa se leagă la fibrinogen, fibronectină, vitronectină și FvW prin secvența comună R-G-D (arginină — glicină — acid aspartic). Secvența R-G-D este un „cod de recunoaștere" în reacțiile celulare adezive. După activarea trombocitului, complexul GP IIb/IIIa suferă o modificare conformațională, permițând legarea fibrinogenului care formează o punte moleculară între trombocite, ducând la agregarea lor. Acest complex lipsește

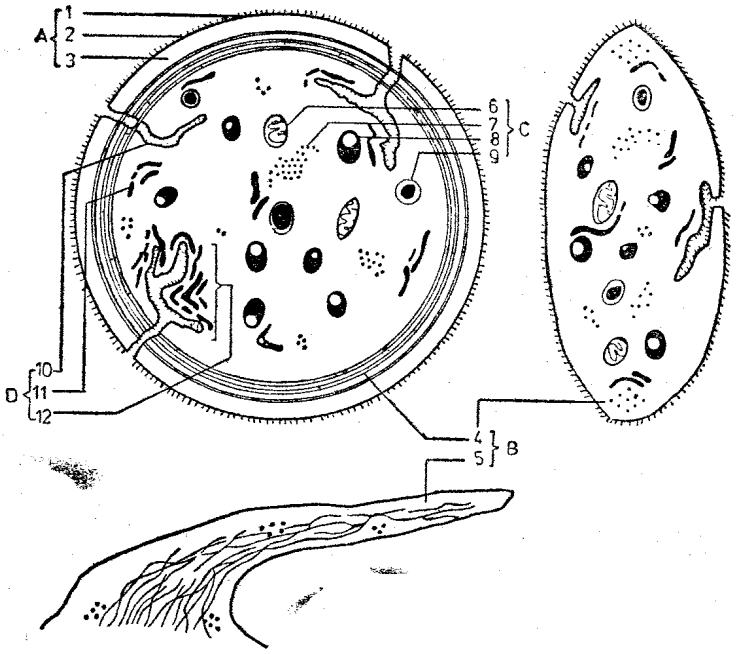


Fig. IX.3. — Ultrastructura trombocitului neactivat, secțiune în plan ecuatorial (I) și sagital (II) și aspectul unui pseudopod al trombocitului activat (III).
Zona periferică (A) constă din glicocalix (1), membrana trilamelară (2) și regiunea submembranoasă (3).
Zona sol-gel (B) constă din microtubuli (4) și microfilamente care devin evidente în cadrul activării.
Zona organitelor (C) conține: mitocondrii (6), glicogen (7), granule α (8) și corpi denși (9).
Sistemul de membrane (D) constă din sistemul canalicular deschis (10), sistemul tubular dens (11) și complexele de membrane (12).

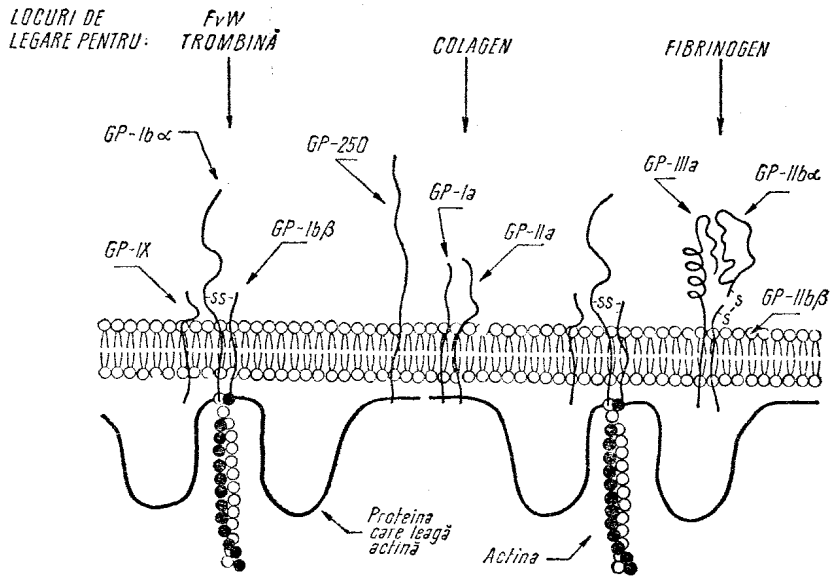


Fig. IX.4. — Structura membranei plachetare (L. F. Brass).
Glicoproteinele membranei, legătura cu citoskeletonul și locurile de legare pentru proteine adezive.

în trombastenia Glanzmann. Pe complexul GP IIb/IIIa se află epitopii cu care reacționează autoanticorpii din majoritatea cazurilor de trombocitopenii imune și epitopii care constituie sistemul antigenic major (PLA) al trombocitului.

Membrana trombocitului conține receptori pentru ADP, trombină, epinefrină, serotonină.

Membrana plachetară este o membrană asimetrică, compusă din fosfolipide și glicolipide. În trombocitul activat porțiunea fosfolipidică a membranei servește ca suprafață pentru interacțiunea unor proteine plasmatice care se asamblează în complexe pe membrana trombocitului.

Zona submembranoasă conține filamente submembranare de actină. Actina submembranară se asociază cu proteina care leagă actina și se leagă la GP Ib. Actina se poate asocia cu α-actină și se leagă de GP IIb-IIIa.

Zona sol-gel (citoskeletonul). În matricea trombocitului se găsesc microtubuli și microfilamente. Menținerea formei de disc este asigurată de un *inel de microtubuli* dispus circumferențial sub membrana plasmatică. *Microfilamentele,* răspândite în citoplasmă, sunt compuse din actină și miozină. Actina, proteina contractilă majoră, reprezintă 20—30% din proteinele trombocitului, iar miozina 2—5%. Microfilamentele se convertesc de la o stare neorganizată gelatinoasă la filamente paralele capabile de contracție în momentul schimbării formei. După activarea trombocitului, creșterea ionilor de calciu intracitoplasmatic activează aparatul contractil și trombocitul își schimbă forma din disc în sferă cu prelungiri. Contracția benzii circumferențiale de microtubuli este responsabilă pentru mișcarea centripetă a organitelor care facilitează procesul de secreție. Microtubulii monitorizează contracția internă a trombocitelor și reglează gradul răspunsului plachetar.

În citoplasmă, trombocitele conțin *trei tipuri de granule:* granule α, granule dense, lizosomi.

Lizosomii conțin o varietate de enzime hidrolitice (hidrolaze acide, β-galactozidaze, heparitinaze, elastază, colagenază), care intervin în procese inflamatorii și în curățirea detritusurilor plachetare.

Corpii denși (numiți astfel fiindcă sunt osmiofili la microscopia electronică) sunt în număr mic (~10 pe trombocit) și conțin ADP, ATP, calciu și aproape toată serotonina și vasopresina din sânge. Eliberarea ADP din granule în cursul activării trombocitare este necesară pentru a recruta alte trombocite spre a forma dopul hemostatic primar.

Bolnavii cu deficit al corpilor denși prezintă tendință la hemoragii.

Granulele α sunt mult mai numeroase (aproximativ 100 pe trombocit) și conțin un număr mare de proteine, care pot fi clasificate în: 1) proteine adezive; 2) proteine modulatoare de creștere; 3) factori de coagulare.

1. *Proteine plasmatice adezive* sunt fibrinogenul, fibronectina, FvW, trombospondina, vitronectina. Trombospondina este eliberată din granulele α de trombină și se leagă la fibrinogen pe suprafața trombocitului. Fibrinogenul este captat din plasmă de megacariocit în cursul formării trombocitelor.

2. *Modulatorii de creştere* conţinuţi în granulele α sunt: factorul de creştere derivat din trombocite (PDGF), peptide de activare a ţesutului conjunctiv (CT AP III), factorul de creştere şi transformare β (FGT β), factorul 4 plachetar.

Factorul 4 plachetar şi β-tromboglobulina sunt *proteine specifice* trombocitului care leagă heparina.

3. *Factorii de coagulare eliberaţi* din granulele α: factorul V, HMWK, CIINN, fibrinogenul, factorul XI, proteina S, inhibitorul 1 al activatorului fibrinogenului (PAI-1).

Un component special al membranelor granulelor a fost recent descris sub denumirea *PADGEM (platelet activation dependent granule external membrane)* sau *6MP-140 (granule membrane protein)* sau P-selectin. Această proteină de 140 kd este prezentă pe suprafaţa internă a membranei granulelor α. După activare, membrana granulelor α fuzionează cu membrana de suprafaţă şi această proteină este expusă pe suprafaţa externă a trombocitului şi serveşte ca un marker al activării plachetare.

Sistemul de membrane. Membrana plasmatică se invaginează extensiv în citoplasma trombocitului, unde formează *sistemul canalicular deschis* (SCD). SCD creşte foarte mult suprafaţa de contact a trombocitului cu constituenţii plasmei şi reprezintă canale de eliminare a conţinutului granulelor în cursul reacţiilor de eliberare.

Pe lângă SCD, trombocitele posedă al doilea sistem de membrane localizat în citoplasmă, *sistemul tubular închis sau dens (STD).* Acest sistem derivă din reticulul endoplasmatic neted al megacariocitului şi este loc de depozitare de calciu şi loc al activităţii ciclooxigenazei.

FUNCŢIILE TROMBOCITELOR

Funcţia trombocitelor în hemostaza normală include:

— oprirea iniţială a sângerării prin formarea dopului hemostatic plachetar (hemostaza primară);

— stabilizarea dopului hemostatic prin contribuţia la procesul de formare a fibrinei (trombocitele furnizează o suprafaţă pe care factorii de coagulare se activează);

— retracţia cheagului;

— menţinerea integrităţii peretelui vascular.

Aspectul morfologic al formării dopului hemostatic plachetar. În mod normal, trombocitele circulă ca fragmente de citoplasmă discoide care nu interacţionează cu alte trombocite sau alte celule. Când trombocitele vin în contact cu endoteliul lezat sau matricea subendotelială se produce o trecere rapidă de la starea neadezivă la starea adezivă. Întreruperea liniei celulelor endoteliale duce la expunerea constituenţilor din matricea subendotelială (colagen, fibronectină, laminină) şi este urmată instantaneu de adeziunea trombocitelor la suprafaţa vasculară lezată (fig. IX.5). Adeziunea este urmată de *schimbarea formei* de disc în sferă cu prelungiri care se întind pentru a acoperi aria lezată. Aceasta este urmată de *reacţiile de eliberare* a conţinutului granulelor (corpii denşi şi granulele α). Eliberarea conţinutului granulelor este legată de intensitatea stimulului. După intensitatea stimulului, granulele dense

se eliberează primele, urmate de granulele α și granulele lizosomale. *ADP* eliberat din granulele dense determină recrutarea altor trombocite din circulație (neaderente la colagenul expus) prin activarea lor și inițiază pe această cale procesul de *agregare trombocitară,* care duce la formarea și creșterea dopului hemostatic primar (hemostaza primară).

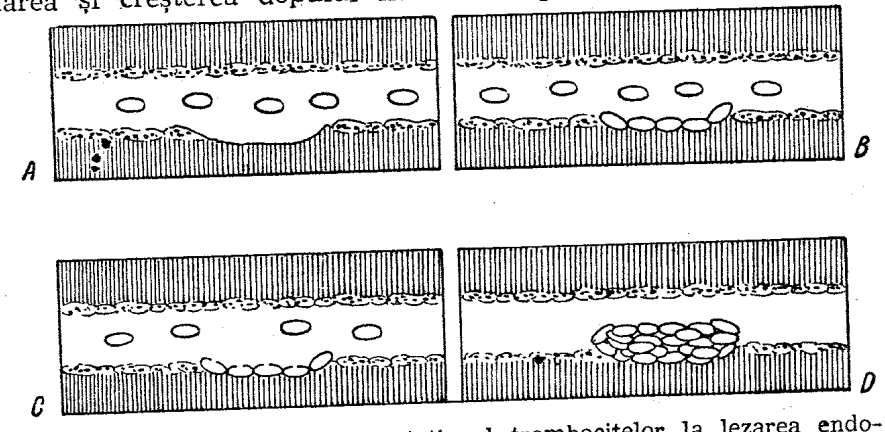


Fig. IX.5. — Răspunsul hemostatic al trombocitelor la lezarea endoteliului.

A: întreruperea continuității endoteliului vascular și expunerea constituenților matricei subendoteliale. B: trombocitele aderă și se întind pe constituenții matricei. C: activarea trombocitelor inițiază secreția. D: constituenții plachetari eliberați pot activa trombocite adiționale care agregă una de alta pentru a forma un trombus (E. F. Plow, M. N. Ginsberg) (30).

Pe lângă colagen și ADP, un alt agonist puternic, *trombina,* este generată pe suprafața trombocitului prin sistemul coagulării plasmatice, care este de asemenea activat prin contactul cu subendoteliul expus. Acest agonist plachetar puternic are un efect sinergic și duce la degranularea adițională a trombocitelor și generarea unui alt agent agregant puternic și vasoconstrictor, *tromboxanul* A_2 *(*TXA_2*).* Importantă pentru recrutarea trombocitelor și formarea agregatelor de trombocite este prezența fibrinogenului. După activare, receptorul pentru fibrinogen de pe membrana trombocitului, GP IIb-IIIa, suferă modificări conformaționale și îi crește afinitatea pentru fibrinogen, care leagă ca o punte un trombocit activat de altul.

În final, pe măsură ce cantități tot mai mari de trombină sunt generate, fibrinogenul din plasmă este convertit în fibrină care consolidează dopul plachetar și formează *dopul hemostatic secundar (hemostaza secundară).*

Aspectul biochimic și de biologie moleculară al activării trombocitelor. In activare au loc:

1) un eveniment inițiator;

2) transducția semnalului;

3) răspunsuri specifice trombocitului: a) rearanjarea citoscheletonului, care duce la schimbarea formei; b) secreția; c) exprimarea receptorilor pentru fibrinogen urmată de agregare; d) exprimarea activității procoagulante pe suprafața trombocitului (fig. IX.6).

Inițierea activării. O varietate de agoniști *produc* sau *susțin* activarea trombocitelor incluzând: constituenți normali ai matricei țesutului conjunctiv subendotelial (colagen, fibronectină), proteine ale plasmei (FvW, fibrinogen), proteaze (trombină), hormoni circulanți (vasopresina, epinefrina) și produse ale metabolismului (ADP și tromboxan A_2). Unii din acești agoniști au *receptori specifici* pe membrana trombocitului. Principalii agoniști sunt colagenul și trombina. Receptorii plachetari pentru

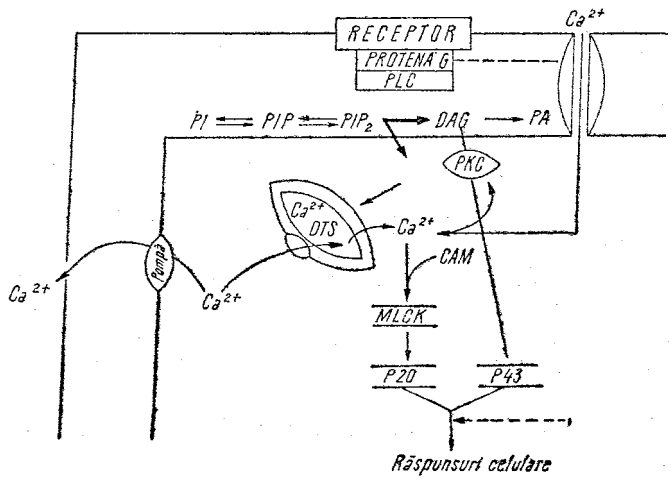


Fig. IX.6. — Mecanismele activării plachetare (E. Dupuy. P. Molhosabatier) (11).
PKC: protein kinaza C; CAM: calmodulin; DTS: sistem tubular dens; MLCK: kinaza lanțului ușor de miozină; P_{20}: lanțul ușor de miozină; P_{43}: plekstrin.

agoniști străbat membrana plasmatică și au unul sau mai multe domenii extracelulare și citosolice. Cea mai mare parte a receptorilor sunt proteine adezive care aparțin familiei *integrinelor.* Domeniul citosolic al receptorului interacționează cu *molecule intracelulare efectorii,* iar activarea lor este modulată de ocuparea receptorului. Moleculele efectoare prezente în trombocit sunt: fosfolipaza C, fosfolipaza A, adenilat ciclaza. *Interacțiunea receptor—efector* cere o proteină adițională care este membră a familiei de *proteine G* (proteine reglatoare care leagă GTP) cu efect inhibitor sau stimulator.

Mecanisme care se opun activării trombocitelor. Celulele endoteliale care limitează spațiul vascular previn contactul între trombocite și colagen și produc prostaciclină (PGI_2), care inhibă răspunsul trombocitar la agoniști.

Inhibitorii plasmatici ca *antitrombină III* (AT III) inactivează orice cantitate mică de trombină care se formează. În momentul în care celule endoteliale sunt îndepărtate ca urmare a unei injurii sau sunt lezate de boală, mecanismele de apărare sunt depășite. *Colagenul* este expus, iar trombocitele aderă, își schimbă forma și se întind de-a lungul fibrelor de colagen. În același timp ia naștere *trombina,* ca urmare a activării căii extrinseci a coagulării prin eliberarea de factor tisular. Trombina produce activarea în continuare a trombocitelor. Leziunea vasculară atrage

neutrofile şi macrofage care produc substanţe ce activează trombocitele, ca factorul activant plachetar (PAF).

Adeziunea trombocitelor este un proces multifactorial care implică receptori speciali pe trombocit.

Trombocitele exprimă pe suprafaţa lor membranară o serie de receptori, glicoproteine esenţiale pentru funcţia lor, care aparţin în cea mai mare parte integrinelor, o familie de molecule de adeziune. Ele sunt implicate în ataşarea trombocitelor de alte molecule adezive, cum sunt fibrinogenul, fibronectina, colagenele de tip I şi III, sau de alte celule. Unele din aceste integrine aparţin grupului activării lente trombocitare VLA *(very lengthy activation)*, care formează o unitate comună GPIIa. O altă moleculă de adeziune GMP-140 (proteina de membrană granulară), denumită şi CD62, din familia selectinelor, este exprimată de trombocitele activate şi de celulele endoteliale.

Glicoproteinele membranei plachetare care aparţin la familii de molecule de adeziune diferite (integrine, selectine) mediază şi interacţiuni diferite. Integrinele VLA sunt mai mult implicate în interacţiunile celulă—matricea extracelulară subendotelială, pe când selectinele, cum sunt GM-140, se află la baza interacţiunilor celulă—celulă; la acest nivel participă şi GPIIIb, care însă necesită trombospondina ca ligand intermediar.

Un rol important în adeziunea trombocitelor revine factorului von Willebrandt.

Factorul von Willebrandt (FvW) este o proteină macromoleculară oligomerică sintetizată de celulele endoteliale şi de megacariocite. În celula endotelială el este depozitat în granule specifice, corpii Weibel-Palade, iar în megacriocite este stocat în granulele α. Endoteliul depozitează, de asemenea, FvW în membrana bazală a vaselor sanguine. Aici el este important pentru aderarea iniţială a trombocitelor în cursul unei leziuni vasculare sau inflamaţii, în care secretagogi fiziologici ca trombina, fibrina sau histamina induc eliberarea de multimeri activi de FvW din corpii Weibel-Palade în sângele înconjurător şi subendoteliu. FvW este responsabil pentru circa 40% din adeziunea totală a trombocitelor. FvW este prezent şi în sângele circulant în două compartimente distincte: FvW plasmatic sintetizat şi eliberat de celulele endoteliale şi FvW în trombocite în care se află în granulele α. Concentraţia de FvW în trombocite este de aproape 60 de ori mai mare decât în plasmă. Trombocitul neactivat are pe suprafaţă pentru FvW receptorul GPIb-GPIX iar cel activat exprimă receptorul GPIIb-IIIa.

FvW este o moleculă deosebit de adezivă şi participă atât la legarea trombocitului la colagen, proces în care formează o punte între glicoproteinele GPIb-GPIX de suprafaţa trombocitelor şi colagen, cât şi la agregarea trombocitelor, pe care o induce, acţionând ca o punte între ele. FvW subendotelial, sau cel plasmatic, sau ambele, acţionează de asemenea ca o punte primară între subendoteliu şi GPIb de pe trombocite, realizând contactul şi legătura trombocitelor cu subendoteliul. Rolul său fiziologic este de importanţă majoră în hemostaza normală. În boala von Willebrandt, anomalia morfologică cea mai evidentă este absenţa adeziunii trombocitelor la buzele microplăgii produse când se efectuează

analiza timpului de sângerare. Studii transfuzionale au arătat că o corectare a timpului de sângerare în boala v.W. gravă necesită atât FvW plachetar, cât și plasmatic.

— *Interacțiunile trombocitului cu componentele matricei extracelulare subendoteliale* (colagen, fibronectină, laminină).

Colagenul reprezintă din proteinele matricei subendoteliale suportul cel mai important pentru adeziune și întindere, fiind cel mai trombogenic agent al acesteia. Adeziunea depinde de starea de maturație și gradul de polimerizare a colagenului. Atât colagenul din țesutul conjunctiv (tipurile I și III), cât și cel din membrana bazală (tip IV) activează trombocitele. Tipul I (monomeric sau tropocolagen) cu structură fibrilară induce numai adeziune. Colagenul polimerizat cu structură cuaternară induce adeziune, secreție și agregare trombocitară. Receptorul specific pentru colagen este situat pe trombocit la nivelul complexului GPIc-GPIIa (receptor de adeziune din familia integrine). Integrina VLA-2 (numită și GPI-IIa) mediază adeziunea trombocitelor neactivate (în repaus) de colagenul de tipurile I și III, interacțiune ce necesită prezența de Mg^{2+}. În interacțiunea trombocite—colagen participă pe lângă integrine și alte glicoproteine ale membranei (G5KDa și G1KDa). Interacțiunea trombocitelor cu colagenul constă probabil dintr-o cascadă de procese de suprafață ce implică diverși receptori exprimați pe trombocitele neactivate, precum și alți receptori (ca GPIIb-IIIa), care reacționează cu colagenul după ce trombocitele au fost activate.

Pe lângă colagen, *alte proteine din matricea subendotelială sunt implicate în adeziune:* fibronectina, laminina, trombospondina.

Fibronectina, proteina dimerică și multimerică, prezentă în plasmă, granulele α ale trombocitului și matricea subendotelială, are doi receptori pe trombocit: VLA_5, asociat cu GPIc-IIa (prezent pe trombocitul neactivat) și GPIIb-IIIa (prezent pe trombocitele activate). *Laminina* este o glicoproteină care permite numai aderarea trombocitelor, fără întindere, și are pe trombocit un receptor VLA_6 (asociat cu GPIc-IIa). *Trombospondina,* proteină trimerică, este secretată de granulele α ale trombocitului, dar a fost pusă în evidență și în alte celule: monocite, fibroblaste, celule endoteliale ș.a. Ea este o proteină multifuncțională. La nivelul trombocitului se atașază de un receptor GP III b, dar are capacitatea de a fixa un spectru larg de macromolecule (pe fibrinogenul atașat de plachete prin receptorul său GPIIb-IIIa) și interacționează cu heparina, fixându-se pe factorul plachetar 4, cu calciul, fibronectina, colagenul și cu alte substanțe. Ea contribuie la stabilizarea agregatelor de trombocite.

Mai multe din proteinele adezive sunt prezentate și în granulele trombocitului și în plasmă și în matricea subendotelială (de exemplu, FvW, fibronectină). Proteinele din toate cele trei surse (matrice, trombocit, plasmă) sunt importante în susținerea adeziunii trombocitare.

Interacțiunile intertrombocitare par să fie realizate prin mai multe mecanisme: a) activarea trombocitului permite fixarea fibrinogenului de receptorul său de pe trombocit GPIIb-IIIa; b) eliberarea de către trombocitele activate de granule α, care au ca efect agregarea ireversibilă a trombocitelor; c) agregatele trombocitare par să fie stabilizate de un mecanism independent de GPII-IIIa, mediat de trombospondină, care se leagă

de suprafaţa trombocitelor prin GPIIIb şi GMP-140. GPIIIb este un receptor pentru trombospondină pe trombocite şi pe monocite.

Interacţiunea trombocite—celule endoteliale este realizată prin molecule de adeziune din familia selectinelor, prin recent demonstrata PECAM-1 moleculă de adeziune exprimată de trombocite şi de celulele endoteliale, cât şi prin factorul von Willebrandt.

Interacţiunea trombocitelor cu neutrofilele şi cu macrofagele mononucleare mediată de molecule de adeziune la nivelul leziunii endoteliale iniţiale, a fost descrisă ca unul din procesele cele mai precoce ale aterosclerozei la care ar participa şi PDGF şi TGF-β.

O interacţiune trombocite—celule tumorale a început să fie studiată recent. S-a sugerat că trombocitele joacă un rol în procesul metastazării şi s-a arătat că trombospondina participă la adeziunea şi răspândirea unor linii de celule tumorale.

O interacţiune trombocite—celule de melanom este mediată de GPIIb-IIIa şi de receptorul GPIIb-IIIa-*like* prezent pe celulele de melanom.

Transducţia semnalului. Legarea unui agonist la receptorul său celular declanşează, prin sistemul de proteine G, mecanismul de transducţie membranară, cu generarea de mesageri secundari care au un rol major în funcţia celulară. Pragul pentru activarea trombocitului poate fi rezultatul unui stimul puternic sau urmarea combinării efectului a doi sau mai mulţi stimuli slabi. Iniţial, activarea trombocitelor *in vivo* este produsă de expunerea la fibrele de colagen sau de prezenţa trombinei, dar rapid ea reflectă acţiunea concertată a mai multor agonişti (din care unii sunt eliberaţi din însăşi trombocit), ceea ce contribuie la amplificarea procesului.

Două căi metabolice joacă un rol central în activarea trombocitelor, *calea fosfoinozitidelor* şi *calea acidului arahidonic*. Ambele căi încep prin hidroliza enzimatică a unui fosfolipid specific de membrană (fig. IX.7).

Calea fosfoinozitidelor începe cu clivarea fosfotidil inozitolului 4—5 bifosfat (PIP_2) de *fosfolipaza C* pentru a forma *inozitol 1, 4, 5-trifosfat* (IP_3) şi diacil—glicerol (DAG). IP_3 şi DAG reprezintă mesageri secundari. IP_3 *eliberează calciu* din sistemul tubular dens. Creşterea Ca^{++} intracitoplasmatic activează kinaza lanţului uşor de miozină (MLCK) care, în prezenţa calmodulinei, fosforilează lanţul uşor de miozină. Fosforilarea lanţului uşor de miozină permite interacţiunea cu actina. Complexul actină—miozină joacă un rol important în contracţie şi duce la centralizarea granulelor. *DAG* (care este hidrofobic şi rămâne asociat cu stratul bilipidic) activează *protein kinaza C* şi duce la fosforilarea proteinelor (proteina P_{43}, lanţul uşor de miozină) şi este implicată în secreţia granulelor şi expresia receptorului pentru fibrinogen.

Calea acidului arahidonic începe cu eliberarea acidului arahidonic din fosfolipidele de membrană prin *acţiunea fosfolipazei* A_2 (activată de creşterea Ca^{2+} intracitoplasmatic) sau prin acţiunea secvenţială a *fosfolipazei C* şi *diacilglicerol lipazei* (fig. IX.8). Acidul arahidonic este transformat în endoperoxizi sub acţiunea ciclooxigenazei plachetare (sensibilă la aspirină) şi în *tromboxan* A_2 (TXA_2) sub acţiunea tromboxan sintetazei. TXA_2 este un stimul puternic pentru activarea trombocitelor şi are un receptor propriu pe trombocit. TXA_2 produce eliberarea conţinutului gra-

nulelor, creşterea Ca^{++} intracitoplasmatic şi inhibă adenilat ciclaza. Tromboxanul A_2 poate difuza prin membrana plasmatică a trombocitului şi poate servi ca mesager între trombocite. TXA_2 are proprietăţi proagregante şi vasoconstrictoare. Metabolismul acidului arahidonic este inhibat de aspirină şi alte antiinflamatoare nesteroide. Aspirina, un acetilator ireversibil al ciclooxigenazei, este un inhibitor puternic al producerii TXA_2 şi previne eliberarea granulelor.

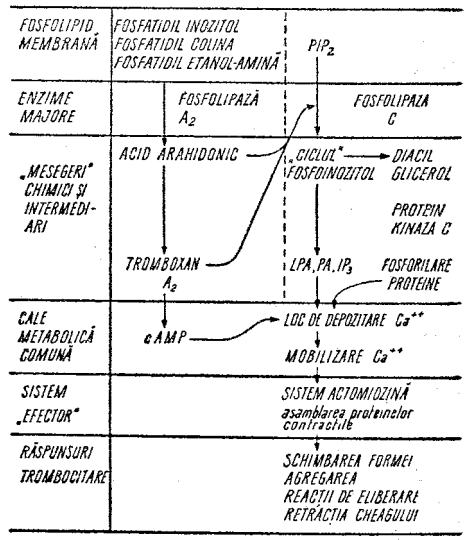


Fig. IX.7. — Căile metabolice de transmitere a „semnalelor" de la receptorii de membrană la sistemul proteinelor contractile (diagramă simplificată după Wintrobe, 1993).

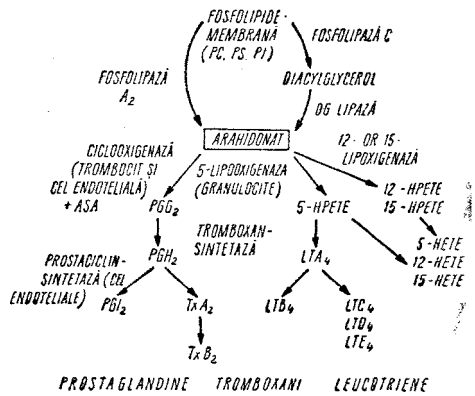


Fig. IX.8. — Formarea arahidonatului şi metabolizarea sa în prostaglandine, tromboxan şi leucotriene.

Arahidonatul este eliberat din fosfolipidele membranei ca fosfatidilcolină (PC), fosfatidil serină (PS) prin acţiunea directă a fosfolipazei A_2 sau din fosfotidilinozitol (PI) prin acţiunea secvenţială a fosfolipazei C şi a diacilglicerol lipazei. În trombocit, arahidonatul este metabolizat pe calea ciclooxigenazei sensibile la aspirină (ASA) pentru a forma tromboxanul A_2. În celula endotelială se formează prostaglandine ca PGI_2. În granulocite neutrofile 5-lipooxigenaza direcţionează metabolismul arahidonatului spre formarea de leucotriene. Trombocitele conţin 12- şi 15-lipooxigenază.

Al treilea mesager secund, a cărui sinteză este afectată prin agonişti plachetari, este *cAMP*, care este format din ATP prin acţiunea adenilat ciclazei. Deşi în majoritatea celulelor el are un efect pozitiv asupra funcţiei, în trombocit el este un *inhibitor al activării*. Agenţii care cresc nivelul cAMP intracelular, ca prostaglandina E_1 şi prostaciclina I_2 (PGE_1 şi PGI_2), prin stimularea adenilat ciclazei deprimă răspunsul trombocitar. Majoritatea agoniştilor supresează producţia cAMP.

Legarea agonistului la receptor este urmată de transducția mesajului și *răspunsul plachetar*, care se desfășoară rapid: *schimbarea formei, secreția, agregarea, ca urmare a expunerii receptorului pentru fibrinogen, exprimarea activității procoagulante pe suprafața trombocitului.*

Schimbarea formei este urmarea rearanjării proteinelor contractile din citoskeleton. Activarea trombocitelor este urmată de transformarea sa rapidă din disc în sferă cu prelungiri (filipode). Examenele în microscopie electronică au arătat o centralizare a organitelor intracitoplasmatice înconjurate de un inel de microtubuli și microfilamente. Activarea trombocitului este urmată de creșterea actinei filamentoase (actină F). Fosforilarea lanțului ușor de miozină în prezența MLCK permite interacțiunea cu actina F, formând filamente de actomiozină (fig. IX.9). Filamentele sunt ancorate la membrană prin atașarea (prin intermediul proteinei care leagă actina) la complexul GPIb-GPIX. Contracția filamentelor ancorate are rol în rearanjarea organitelor și secreție. Filamentele de actomiozină se proiectează și în filopode. Inelul de microtubuli se contractă după activare, iar granulele se mișcă spre centrul celulei.

Secreția. După activare, trombocitele secretă conținutul granulelor lor intracitoplasmatice: corpii denși, granulele α și granulele lizosomale (fig. IX.10). Acest fenomen implică o fuziune a membranei granulelor cu membrana plasmatică pentru corpii denși și cu sistemul de legătură cu suprafața pentru granulele α. Fuziunea membranelor este un mecanism dependent de calciu care destabilizează stratul dublu fosfolipidic. Fenomenul secreției este inhibat de agenții farmacologici care cresc nivelul cAMP și diminuează concentrația intracitoplasmatică a calciului. Pentru inductorii slabi (ADP, adrenalină, concentrații mici de colagen sau trombină), secreția este inhibată total de inhibitorii ciclooxigenazei. Pentru in-

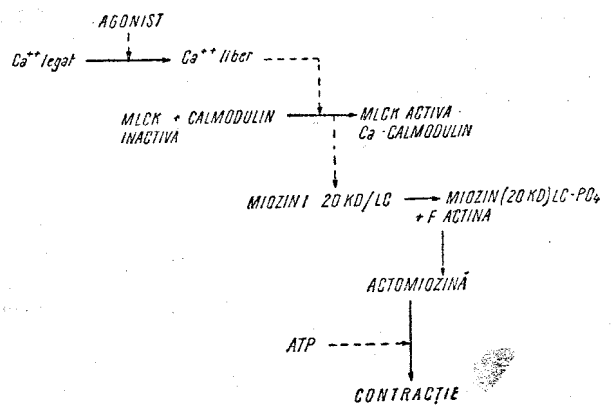


Fig. IX.9. — Sistemul actomiozinei trombocitare. Activarea contracției prin eliberarea calciului legat (Wintrobe, 1993). ——→ acțiuni; ———→ activări.

ductorii puternici — trombină, colagen în concentrații mari — fenomenul de secreție persistă după inhibiția ciclooxigenazei, fiindcă acești agenți sunt capabili să mobilizeze calciul independent de formarea TXA_2. Eliberarea conținutului granulelor dense a fost denumită reacție de eliberare I, iar a conținutului granulelor α — reacție de eliberare II. Trombina

este capabilă să inducă ambele tipuri de reacţii, în timp ce ADP induce numai reacţie de eliberare de tip I. Eliberarea conţinutului granulelor în timpul activării este importantă, pentru că amplifică „răspunsul" trombocitului la locul injuriei.

Corpii denşi (granulele δ) conţin ADP, ATP, ioni bivalenţi, amine bioactive. ADP este un agonist care recrutează noi trombocite la cele aderente de leziunea vasculară şi induce agregarea trombocitelor. ATP este

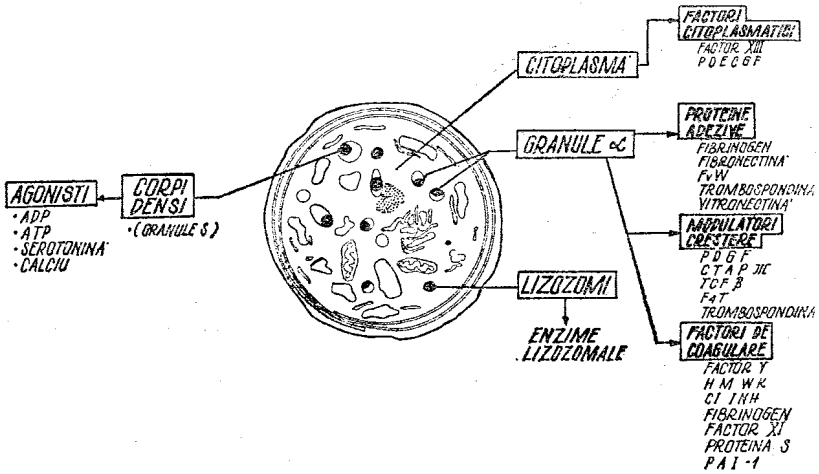


Fig. IX.10. — Substanţele eliberate din trombocit (E. F. Plow, M. N. Ginsberg) (30).

agonist pentru alte celule sanguine. Serotonina influenţează tonusul vascular. Calciul este implicat în acţiunea unor enzime de coagulare dependente de calciu.

Granulele α conţin un număr mare de proteine: modulatori de creştere, proteine de coagulare, proteine adezive. *Modulatorii de creştere* [factorul de creştere derivat din trombocit (PDGF) care este un mitogen puternic, peptida de activare a ţesutului conjunctiv (CTAP III), factorul de creştere şi transformare β (TGF β), factorul 4 plachetar, trombospondina] au rol în modularea creşterii celulelor din peretele vascular. Participarea unei eliberări crescute de PDGF şi TGFβ este discutată în aterogeneză. O mare varietate de *proteine de coagulare* sunt prezente şi eliberate din granulele α: factor V, fibrinogen, proteină S, inhibitor al activatorului plasminogenului (PAI-1). Factorul V joacă un rol important în asamblarea protrombinazei, care este implicată în treapta finală a coagulării, formarea fibrinei. Proteina S este cofactorul proteinei C, iar PAI-1 este un inhibitor al urokinazei şi activatorului tisular al plasminogenului. Prezenţa acestor proteine sugerează că trombocitul ar putea fi un loc favorabil pentru acţiunea anticoagulantă a proteinei C. Eliberarea locală a PAI-1 din trombocit modulează evenimentele fibrinolizei în vecinătatea trombusului.

Granulele α conţin *proteine adezive plasmatice* ca: fibrinogen, fibronectină, FvW şi vitronectină şi *proteine adezive celulare* şi *plachetare:* trombospondină. Acestea fac parte din sistemul de proteine care promovează interacţiunile de contact cu rol în interacţiunea trombocit — ma-

trice subendotelială, trombocit — trombocit și trombocit — proteine de coagulare (13).

Trombocitele sunt o sursă minoră de *enzime lizosomale* în comparație cu neutrofilele. Dintre enzimele lizosomale este de menționat *heparitinaza*, care poate cliva glucozaminoglicani de pe suprafața endoteliilor.

Substanțele eliberate din trombocit au cinci acțiuni principale: 1) stimulează sau inhibă trombocitul sau alte celule sanguine și vasculare; 2) modifică proprietățile mecanice ale trombusului; 3) reglează coagula-

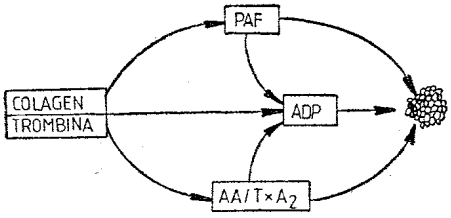


Fig. IX.11. — Căile principale care duc la agregarea trombocitelor (după G. Gaetano, 1981) (9).

rea; 4) contribuie la evenimentele adezive; 5) modulează creșterea celulelor din pereții vasculari. Trombocitele nu au numai un rol mecanic în a astupa breșa vasculară, dar au, de asemenea, capacitatea de a-și semnala prezența într-un trombus pe mai multe căi.

Agregarea trombocitelor reprezintă capacitatea lor de a adera între ele. Numeroase substanțe sunt capabile *in vitro* sau *in vivo* să inducă agregarea trombocitelor ca: ADP, colagen, trombină, adrenalină, acid arahidonic, endoperoxizi, tromboxan A_2, tripsină, complexe imune, agregate de imunoglobuline, PAF.

În general, se acceptă trei căi principale care duc la agregarea trombocitelor: 1) ADP; 2) acidul arahidonic (în realitate endoperoxizii prostaglandinici și tromboxanul A_2) și 3) PAF. Așa cum apare în fig. IX.11, toate aceste trei căi pot fi activate de trombină (rezultată din coagularea sângelui) și de colagen (expus în urma leziunii peretelui vascular). La rândul lor, acidul arahidonic și PAF pot duce la eliberarea de ADP, care are un rol major ca modelator al agregării trombocitelor.

Agregarea inițială este produsă de ADP eliberat din trombocitele aderente la subendoteliu. ADP, un inductor puternic al agregării, transformă trombocitele din disc în sferă cu prelungiri. Aceste sfere cu prelungiri interacționează una cu alta pentru a forma o masă de trombocite agregate. Pentru interacțiunea trombocit—trombocit este nevoie de calciu și fibrinogen. Receptorul pentru fibrinogen de pe membrana plachetară este GPIIb-IIIa.

Fibrinogenul formează adevărate punți între complexele GPIIb-IIIa de pe trombocitele activate și permite agregarea lor. Rolul cheie al fibrinogenului în acest proces este demonstrat de cazurile de afibrinogenemie congenitală, la care agregarea trombocitară este absentă și timpul de sângerare prelungit. Fibrinogenul prezintă două domenii de recunoaștere pentru trombocit: a) un domeniu situat pe secvența carboxiterminală a lanțului γ și b) un domeniu pe porțiunea carboxiterminală a lanțului α și care conține secvența R-G-D (codul de recunoaștere al proteinelor adezive). Legarea fibrinogenului pe GPIIb-IIIa este dependentă de calciu și este precedată de rearanjarea citoscheletonului (schimbarea formei).

Receptorul pentru fibrinogen este *complexul GPIIb-IIIa*, care este un heterodimer dependent de calciu şi care aparţine familiei de integrine. Pe trombocitele stimulate cu trombină el este receptor pentru FvW şi fibronectină. Rolul major al GPIIb-IIIa în agregarea plachetară este dovedit de trombastenia Glanzmann, în care trombocitele trombastenice nu posedă GPIIb-IIIa şi sunt incapabile să se agrege şi să lege fibrinogenul.

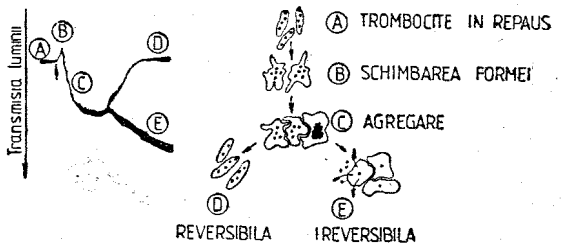


Fig. IX.12. — Secvenţa de evenimente care apar *in vitro* într-un agregametru după adaos de ADP (stânga) şi aspectul trombocitelor în microscopie electronică în timpul agregării redate într-o formă simplificată (dreapta) (după G. Gaetano) (9).

Formarea TXA_2 ca urmare a activării căii metabolice a acidului arahidonic duce la expunerea de noi complexe de GPIIb-IIIa pe membrană şi la formarea de noi agregate plachetare prin recrutarea de noi trombocite. Eliberarea proteinelor adezive din granulele α ca urmare a activării trombocitelor joacă, de asemenea, un rol în formarea agregatelor plachetare. Trombospondina se leagă la GPIV, iar FvW şi fibronectina la complexul GPIIb-IIIa.

În fig. IX.12 sunt schematizate comparativ fenomenele care au loc *in vitro* într-un agregametru şi modificările trombocitare din cursul agregării (9). După adaosul stimulului de agregare (ADP în concentraţii micromolare) în câteva secunde trombocitele îşi schimbă forma (din cea de disc în sferă cu prelungiri). În acelaşi timp, corpii denşi intracelulari (care conţin nucleotide şi serotonină) devin centralizaţi. Ca rezultat al formării pseudopodelor, trombocitele agregă. Dacă stimulul nu a fost suficient de puternic agregatele se dezintegrează în câteva minute şi organitele interne se redistribuie (agregare reversibilă). Dacă stimulul a fost suficient de puternic pentru a activa metabolismul acidului arahidonic, se produce reacţia de eliberare şi trombocitele suferă o agregare secundară ireversibilă. La microscopia electronică aceste trombocite apar aproape golite de corpii denşi.

Activitatea procoagulantă. Trombocitele activate secretă factor V, fibrinogen din granulele α şi calciu din granulele dense.

Activarea plachetară antrenează un rearanjament al fosfolipidelor membranei şi trombocitele demască activitatea procoagulantă, din care cea mai importantă este factorul 3 plachetar. Acest factor depinde de disponibilitatea de fosfolipide membranare care nu sunt accesibile pe trombocitul neactivat. Vezicule fosfolipidice sunt exprimate pe suprafaţa trombocitelor activate prin fenomenul de „flip-flop". Pe această suprafaţă au loc reacţiile biochimice care duc la generarea trombinei, enzima cheie a coagulării. Aceasta începe cu legarea la membrana trombocitului a factorului V din trombocit sau din plasmă. Când este activat, factorul V serveşte ca receptor pentru factorul Xa, formând complexul protrombinazei, care converteşte protrombina la trombină pe suprafaţa trombocitului. Factorul Xa legat de trombocit este protejat de efectul in-

hibitor al antitrombinei III. Legarea factorului Xa la Factorul Va pe suprafața trombocitului protejează factorul Va de inactivare prin proteina C activată.

Asocierea factorilor cu veziculele fosfolipidice pentru a forma complexul protrombinazei crește viteza de generare a trombinei de 5 ori. Trombina formată permite transformarea fibrinogenului în fibrină care consolidează agregarea trombocitară.

O serie de factori (XII, XI, IX) din sistemul intrinsec al coagulării au o activitate crescută pentru substratul lor când se leagă pe trombocitele activate.

Retracția cheagului. Retracția cheagului, observată *in vitro* după coagularea sângelui, rezultă din contracția pseudopodelor trombocitare ancorate pe benzile de fibrină. Ea se face sub acțiunea *actomiozinei* (trombosteninei). Acest fenomen, descris *in vitro,* intervine probabil și *in vivo* în consolidarea dopului trombocitar. În tabelul 9.I sunt prezentate funcțiile trombocitelor și rolul lor în patologie.

TABELUL 9.I

Funcțiile trombocitare și rolul lor în patologie
(modificat după H. J. Weiss, 1978)

I. *Hemostază:*
1. Oprirea primară a sângerării
2. Coagularea sângelui
3. Integritatea endoteliului vascular

II. *Tromboză:*
1. Tromboze ale arterelor mari (coronare, carotidă internă, cerebrale etc.)
2. Tromboze ale microcirculației (microangiopatii, boală glomerulară renală, rejecție de grefă și alte tromboze mediate imun, diabet zaharat)
3. Proteze valve cardiace
4. Tromboze venoase (±)

III. *Alte stări patologice:*
1. Ateroscleroză
2. Leziuni mediate imun
3. Inflamație
4. Vasospasm
5. Fagocitoză
6. Metastaze

Menținerea integrității peretelui vascular. De mult timp se știe că trombocitul ajută la menținerea integrității endoteliului vascular. Când cifra trombocitelor scade, permeabilitatea capilară crește și celulele sanguine trec spontan printre celulele endoteliale în afara lumenului vascular și apare purpura. Supraviețuirea organelor izolate este mai bună dacă sunt perfuzate cu lichide care conțin trombocite. Trombocitul aprovizionează endoteliul cu metaboliți ai acidului arahidonic și furnizează factori de creștere care cresc viabilitatea celulelor endoteliale. Trombocitele activate pot stimula proliferarea celulelor musculare netede ale arterelor prin eliberarea de PDGF și TGFβ.

La rândul său, endoteliul are efecte asupra trombocitului. Celula endotelială este sursa majoră de FvW și de materiale active biologic, ca prostaciclina (PGI_2), un vasodilatator puternic și inhibitor al funcției trombocitare.

PATOLOGIA TROMBOCITELOR

Tulburările trombocitare pot fi împărțite în două categorii: cantitative și calitative.

Tulburările calitative sunt reprezentate de scăderea (trombocitopenii) sau creșterea numărului de trombocite (trombocitoze).

TABELUL 9.II

Clasificarea patogenică a trombocitopeniilor

I. *Deficit de producție*

1. Scăderea numărului de megacariocite din măduvă:
   a) Aplazii medulare (radiații ionizante, substanțe chimice, medicamente, infecții idiopatice)
   b) Infiltrarea măduvei (leucemii, limfoame, mieloame, mielofibroză, metastaze carcinomatoase, granuloame)
   c) Congenitale (pancitopenia Fanconi, trombocitopenia amegacariocitară cu absența radiusului, trombocitopenia autosomală recesivă, trombocitopenia ciclică, rubeola neonatală, ingestia maternă de diuretice tiazidice)
2. Trombocitopoieza ineficace:
   a) Deficit de vitamină B_{12} și acid folic
   b) Preleucemii
   c) Sindrom Di Guglielmo
   d) Hemoglobinurie nocturnă paroxistică
   e) Ereditare (trombocitopenie autosomală dominantă cu nefrită, surditate și trombocite gigante, anomalie May-Hegglin, sindrom Wiskott-Aldrich)
3. Deficit de trombopoietină

II. *Distribuție anormală*

1. Splenomegalie (congestivă, neoplazică, infiltrativă, infecțioasă)
2. Anestezie hipotermică

III. *Distrucție accelerată*

1. Mecanism imun: a) purpură trombocitopenică idiopatică acută și cronică; b) secundară: purpură trombocitopenică la medicamente, purpură prin alloanticorpi (posttransfuzională, neonatală), trombocitopenii imune asociate cu boli de colagen, limfoproliferări, boli ale tiroidei, infecții (mononucleoză infecțioasă, SIDA)
2. Mecanism neimun („consum") (purpura trombotică trombohemolitică, sindrom hemolitic uremic, malarie, coagulare intravasculară diseminată, cardiopatii congenitale cianotice, septicemie, hemoglobinurie paroxistică-nocturnă, angiom cavernos, vasculite, proteze valvulare)

IV. *Diluție sau pierderi neînlocuite*

1. Transfuzii masive
2. Circulație extracorporeală

Trombocitopeniile reprezintă în practică cauza cea mai frecventă a sângerărilor. Mecanismul lor de producere este inclus în tabelul 9.II.

Trombocitozele pot fi împărțite în două grupe: reactive și autonome (trombocitemia hemoragică).

Tulburările calitative *(trombopatii)* pot fi ereditare sau câștigate. Din grupa trombopatiilor ereditare fac parte boli sau sindroame rare,

cu defecte genetice specifice. Clasificarea lor apare în tabelele 9.III și 9.IV și fig. IX.13. Trombopatiile câștigate apar în cursul unor boli cu etiologie diversă și după ingestia unor medicamente. Ele se caracterizează clinic prin hemoragii care alternează frecvent cu complicații trombotice. Trombocitele sunt normale numeric, dar TS este deseori prelungit.

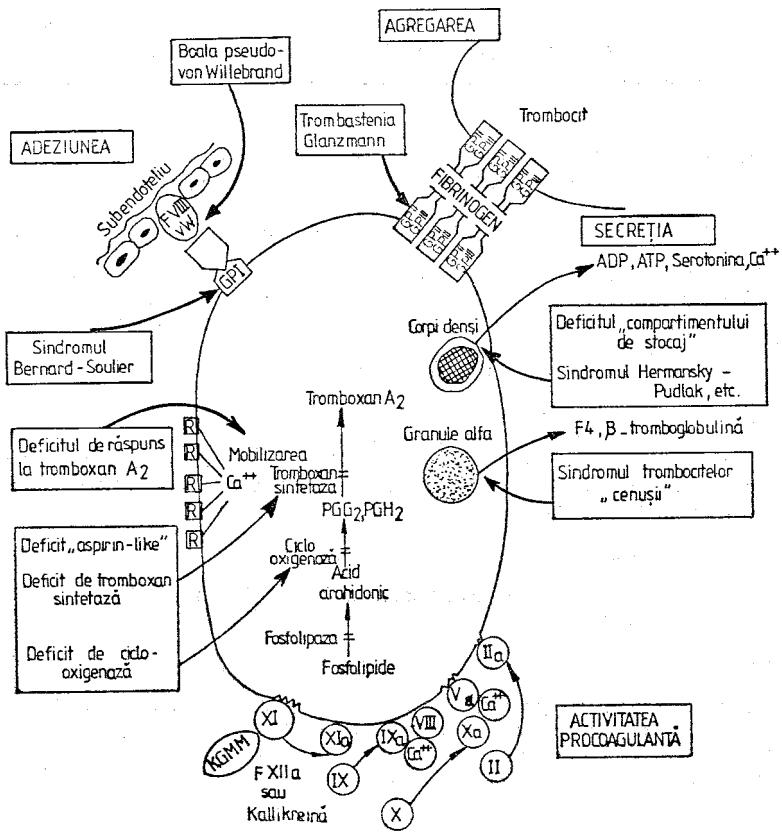


Fig. IX.13. — Reacțiile trombocitare și repartizarea schematică a localizării tulburărilor în trombopatii ereditare (A. Roak, P. N. Walsh, 1983) (26).

TABELUL 9.III

Trombopatii ereditare

I. *Defecte ale membranei plasmatice*

Trombastenia
Sindromul Bernard-Soulier
Boala pseudo-von Willebrand
Defect procoagulant primar

Continuare tabelul 9.III

II. *Deficitul organitelor de stocaj*

a) *Deficitul corpilor denși:*
Sindromul Hermansky-Pudlak
Sindromul Wiskott-Aldrich
Sindromul Chediak-Higashi
Trombocitopenia cu absența radiusului
Idiopatică
b) *Deficitul granulelor* α:
Sindromul trombocitelor gri
c) *Deficitul corpilor denși și ale granulelor* α

III. *Defecte ale sintezei tromboxanului:*

Deficit de ciclooxigenază
Deficit de tromboxan sintetază

IV. *Deficit în răspunsul la tromboxan* A_2

V. *Diverse:*

Sindromul Montreal
Sindromul Epstein
Anomalia May-Hegglin

TABELUL 9.IV

Stările patologice asociate cu trombopatie câștigată

***Bolile** mieloproliferative cronice*

Policitemia vera
Leucemia granulocitară cronică
Trombocitemia hemoragică
Mielofibroza

***Stările** preleucemice și leucemii acute*

***Stările** asociate cu macromolecule circulante*

Macroglobulinemia Waldenström
Mielomul multiplu
Administrarea de dextran

***Bolile** renale cronice asociate cu uremie*

***Deficitul** câștigat al compartimentului de stocaj*

***By pass-ul** cardiopulmonar*

***Coagularea** intravasculară diseminată*

Boli de ficat

***Anticorpi** antiplachetari*

***Ingestia** de medicamente*

Aspirină
Agenți antiinflamatori nesteroizi
Penicilină și cefalosporină

BIBLIOGRAFIE

1. BECKER R. P., DE BRUYN P. P. M.: Am. J. Anat. 1976; 245: 183.
2. BERCEANU ŞT.: Hematologie clinică. Edit. Medicală, Bucureşti, 1977.
3. BENVENISTE J., HENSON P. M., COCHRANE G. G.: J. Exp. Med. 1972; 136: 1356.
4. BRASSE L. F.: În HOFFMAN R., BENZ E. J. Jr., SHATTIL S. J., ENRIC B., COHAN H. J. (eds.): Hematology basic principles and practice, 1991, 1176.
5. BRETON-GORIUS J., VAINCHENKER W.: Semin. Haemat. 1986; 23: 43.
6. BURSTEIN S. A., HARKER L. A.: În: Clinics in hematology, 1983; 12: 3.
7. BUTOIANU E., NICOARĂ S.: Vademecum hematologic. Edit. Medicală, Bucureşti, 1973.
8. CUCUIANU M.: Biochimia clinică a hemostazei. Edit. Dacia, Cluj-Napoca, 1983.
9. DE GAETANO G.: Clin. Haematol. 1981; 10: 297.
10. DREYFUS B.: L'Hématologie. Médecine-Sciences, Flammarion, Paris, 1981.
11. DUPAY E., MOLHO-SABATIER P.: În DREYFUS B. (ed.): L'Hématologie, Médecine-Sciences, Flammarion, Paris, 1109.
12. GARG S. K., AMOROSI E. L., KARPATKIN S.: New Engl. J. Med. 1971; 284: 11
13. GEORGE N. J., Nurden A. T., PHILIPS D. R.: New Engl. J. Med. 1984; 311: 1084.
14. GEORGE J. N., BALLEM P. J., BURSTEIN S. A.: Hematology, 1993, 75.
15. GEWIRTZ A. M., PONCZ M.: În HOFFMAN R., BENZ E. J. Jr., SHATTIL S. J., FURIE B., COHEN N. J. (eds.): Hematology. Basic Principles and Practice, 1992, 1148.
16. HARDISTY R. M.: Clin. Haematol. 1983; 12: 153
17. HARKER L. A.: J. Clin. Invest. 1968; 47: 458.
18. HELLEM A. J.: Scand. J. Haematol. 1970; 7: 374.
19. HOFFMAN R.: Blood 1989; 74: 1196.
20. HUGUES J.: Thromb. Diath. Haemorrh. 1959; 3: 177.
21. HUMPHREY J. M.: Nature 1955; 176: 38.
22. ISENBERG W. M., BAINTON D. F.: În HOFFMAN R., BENZ E. J. Jr., SHATTIL S. J., FURIE B., COHEN H. J. (eds.): Haematology. Basic Principles and Practice, 1991, 1157.
23. KUTER D. J.: În Beck W. S. (ed.): Hematology, 1992, 543.
24. MALDONADO J. F., PINTADO I., PIERRE R. V.: Blood 1974; 43: 797.
25. LEVINE R. F., BUNN P. A., HAZZARD K. G. şi colab.: Blood 1980; 56: 210.
26. RAO A. K., WALSH P. N.: Clin. Haematol. 1983; 12: 202.
27. RADLEY J. M., HALLER C. J.: Blood 1982; 60: 213.
28. RABELLINO E. M., LEVENE R. B., LAWRENCE L. K. şi colab.: J. Exp. Med. 1981; 154: 88.
28. PARMENTIER SOPHIE şi colab.: Immunol. To Day 1990; 225.
29. PENINGTON D.: În BLOOM AL., THOMAS D. P. (eds.): Haemostasis and Thrombosis — Thrombopoiesis. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1—21.
30. PLOW E. F., GINSBERG M. H.: În HOFFMAN R., BENZ E. H. Jr., SHATILL S. J., FURIE B., COHEN H. J. (eds.): „Hematology. Basic Principles and Practice", 1991, 1165.

30a. SCHICK BARBARA: New Engl. J. Med. 1994; 331: 875.

31. TAVASSOLI M.: Blood 1980; 55: 537.
32. THIERY J. P., BESSIS M.: Rev. Hematol. 1956; 2: 162.
33. TROWBRIDGE E. A.: Blood Cells 1988; 13: 451.
34. VAINCHENKER W., DESCHAMPS J. F., BASTIN J. M. şi colab.: Blood 1982; 59: 514.

35. VAZQUES J. J., LEWIS J. H.: Blood 1960; 16: 968.
36. VERMYLEN J., BADENHORST P. N., DECKMYN H. și colab.: Clinics in Haematology 1983; 12: 107.
37. WEISS H. J.: New Engl. J. Med. 1978; 298: 1344.
38. WESTE S. M., PENINGTON D. G.: J. Histoch. cytoch. 1972; 20: 626.
39. WILLIAMS W. J., BEUTLER E., ERSLEV A. J.: Hematology, ed. a 3-a. McGraw-Hill Book Company, New York, 1983.
40. ZAJICEK J.: Acta Physiol. Scand. 1957; 40: 138.
41. ZUCKER-FRANKLIN O., GREAVES M. F., GROSSI C. E., MARMOT A. M.: Atlas of blood vells. Function and pathology. Edit. Emes, Milano, 1988, 621.
42. ZUCKER-FRANKLIN O., PETERSSON S.: J. Cell. Biol. 1984; 99: 390.
43. YAMADA E.: Acta Anat. 1967; 29: 267.

X

SERIA LIMFOPLASMOCITARĂ

IOANA RĂILEANU-MOȚOIU

Definiție și istoric. Protecția organismului față de numeroșii agenți patogeni din mediu este asigurată de sistemul imun. Principalii mediatori ai imunității sunt celulele limfocitare înzestrate cu specificitate funcțională, datorită căreia reacțiile imune se produc cu maximum de eficiență, ca și de economie din partea organismului.

Limfocitele, care reprezintă în jur de 25% din leucocitele sângelui circulant, constituie componenta celulară majoră din țesuturile limfatice și se regăsesc și în alte țesuturi. Sunt celule mici, rotunde, aproape monomorfe morfologic, dar heterogene ca origine, grad de maturație și capacitate funcțională (planșa a V-a). Spre deosebire de celelalte celule sanguine, limfocitele recirculă între sânge și organele limfatice, deținând în majoritatea lor o lungă durată de viață, în cursul căreia își păstrează specificitatea de recunoaștere și de reacție față de antigene.

Prima mențiune cu descriere a celulei limfatice a fost făcută, în 1774, de către W. Newson, iar în a doua jumătate a secolului al XIX-lea Waldeyer a descris plasmocitul. Ehrlich (1879) consacră numeroase studii limfocitului, iar rolul acestora în imunitate este susținut peste 10 ani de către Pfeiffer. În acea perioadă, limfocitele erau socotite ca entități cu evolutivitate finită, în mod similar cu celelalte celule sanguine. În 1928, Maximow a sugerat potențialul de dezvoltare al limfocitului mic pe baza studiilor histogenetice și culturi de țesuturi, potențial demonstrat de Nowell prin tehnica culturilor de sânge stimulate cu fitohemaglutinină (PHA). Cercetările asupra funcției limfocitare s-au cristalizat în urma observațiilor clinice, a experimentelor pe animale, a tehnicilor de imunologie și de genetică moleculară. Cunoașterea rolului timusului în imunitate, în maturarea limfocitară, la care se adaugă cel al țesuturilor echivalente bursei Fabricius de la păsări au condus la conceptul existenței a două mari grupuri de limfocite ce diferă ontogenetic, structural și funcțional: limfocitele T (Theta) și limfocitele B *(Bone marrow)*. În răspunsul imun, limfocitele T sunt efectorii reacțiilor mediate celular,

iar limfocitele B cu diferențiere în plasmocite sunt efectorii imunității umorale. Studiul membranei limfocitare prin tehnica fenotipării imune cu anticorpi monoclonali (20) a deschis o etapă nouă în imunologie. Se pot identifica astfel subpopulațiile T sau B cu funcții diferite, se dovedește relația limfocit B — plasmocit și se conturează cooperarea cu celulele monocitare-macrofage în răspunsul imun. Heterogenitatea celulelor limfoide dovedită prin tehnicile moderne confirmă părerea lui Heilmeyer că limfocitele reprezintă sisteme celulare asemănătoare morfologic, dar diferite funcțional (16).

MORFOLOGIE

Microscopie optică. Limfocitele reprezintă 20—45% (2 500/mm^3) din leucocitele sanguine, sunt celule rotunde, în general mici (diametrul 7—10 μm) sau mijlocii (12—14 μm), formele mari (15—20 μm) fiind mai rar întâlnite. Nucleul central bine conturat, rotund sau ușor incizat, este de tip matur, cu cromatina dispusă în benzi groase, neregulate, ce maschează nucleolii. Citoplasma, cantitativ redusă, poate fi mai abundentă la formele mari, are o transparență hialină, se colorează în albastru de nuanța „cerului senin" la coloratia panoptică, respectând un halou clar perinuclear. Limfocitele mici sunt agranulare. Unele, însă, conțin granulații azurofile sferoidale nerefringente înăuntrul unor mici vacuole (fig. X.1).

La subiectul normal nu se întâlnesc celule limfoblastice în sângele periferic. În organele limfatice însă, celulele limfoblastice reprezintă stadii de activare celulară sub stimul antigenic. Se descriu mai multe tipuri de blaști:

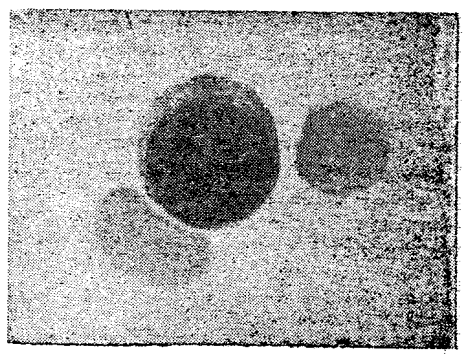


Fig. X.1. — Limfocit sanguin (colorație May-Grünwald-Giemsa).

a) *Limfoblaștii,* cu diametrul de 12—18 μm, au nucleu sferoidal, cu cromatina dispusă în travee fine, egale și un singur nucleol. Citoplasma, relativ redusă, este bazofilă, cu halou perinuclear și agranulară.

b) *Centroblaștii* din centrii germinativi ai foliculilor limfatici pot avea dimensiuni variind de la 10 la 20 μm; au nucleul mare, sferic, plasat central, cu cromatină fină, uniform reticulată. Caracteristici sunt nucleolii situați lângă membrana nucleară. Citoplasma este intens bazofilă.

c) *Imunoblaștii* sunt celule mari, de 20—25 μm cu nucleu sferic sau oval, cromatină în rețea și nucleoli mari, albaștri. Citoplasma, abundentă, este intens bazofilă, cu vacuole. Prin testarea markerilor celulari se pot deosebi imunoblaști de linie T sau de linie B. Ultimii reprezintă precursorii plasmocitelor (plasmoblaști). Pe măsura orientării lor spre plasmocite, plasmoblaștii capătă caractere morfologice proprii, ca: di-

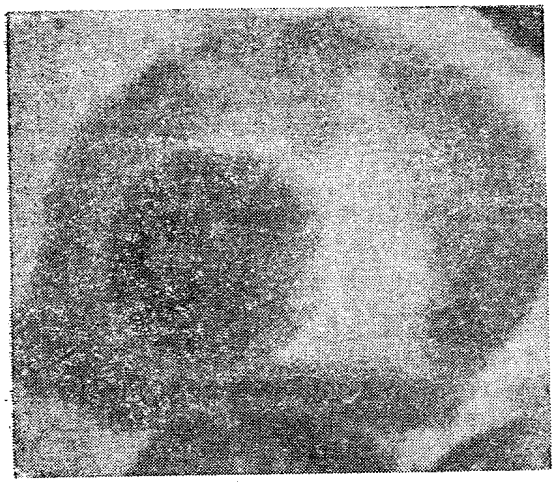


Fig. X.2. — Plasmocit (coloraţie May-Grünwald-Giemsa).

mensiune mai mică decât imunoblaştii T, nucleu sferic excentric cu stromă cromatiniană evidentă şi intensă bazofilie citoplasmatică.

d) *Proplasmocitele*, denumite şi celule de iritaţie Türck, prezintă unele îngroşări ale cromatinei nucleare, cu dispunere radială şi 2—3 nucleoli. Citoplasma, în cantitate variabilă, este bazofilă, cu halou perinuclear.

Plasmocitul are dimensiuni ce variază între 7 şi 25 μm diametru, descriindu-se forme mici, medii şi mari. Celula este ovală, cu nucleul sferoidal, plasat excentric, ce are cromatină în blocuri dense, inegale, orientate fie în „spiţe de roată", fie în „carapace de broască ţestoasă". Citoplasma abundentă, neomogenă, este intens bazofilă. Juxtanuclear se află o zonă mai palidă, arhoplasma, iar marginal se pot observa vacuole (fig. X.2). Celula este agranulată, dar patologic se pot găsi incluzii de amiloid sau granule de hemosiderină. În unele cazuri, în citoplasmă se acumulează un material glicoproteic sub formă de sferule, realizând aspectul de mură sau celulă „Mott". Din fragmentarea acesteia rezultă „corpii Russell".

Microscopia în contrast de fază permite observarea directă, în stare vie, a limfocitului. Acesta apare ca o celulă mobilă ce nu aderă la sticlă.

Fig. X.3. — Limfocit în locomoţie „oglindă cu mâner" (contrast de fază).

Are mișcări polarizate, de înaintare a nucleului urmat de o codiță citoplasmatică, realizând aspectul de „oglindă cu mâner" (fig. X.3). Uneori, când străbate spații înguste, plasmocitul are mișcări vermiculare. Acest tip de motilitate este deosebit de cel al monocitelor și seriei mieloice, care emit pseudopode împrejur, în mod nepolarizat. În unele situații, limfocitele prezintă o formațiune citoplasmatică mobilă, ascuțită, denumită „uropod", care ar avea un rol de stabilire de contacte intercelulare, în recunoașterea antigenului. Asemenea contacte cu orientarea limfocitelor în jurul altui tip de celulă (macrofag, celulă malignă, celulă fibroblastică), aspect denumit „peripolesis", au fost observate în culturi de țesuturi și, mai rar, pe secțiuni histologice de ganglion limfatic. Aceste aspecte sugerează schimburi de informație în cadrul unui răspuns imun. Limfocitele au capacitatea de a pătrunde activ în alte celule, traversându-le. Fenomenul poate fi observat în culturi de țesuturi, reproducând același proces *in vivo*, de traversare a celulelor endoteliale vasculare și epiteliale din mucoasa intestinală.

Microscopia electronică. Prin tehnica de transmisie TEM, nucleul limfocitar prezintă cromatină abundentă, electronodensă și condensată, nucleoli rotunzi și membrană nucleară cu pori. În citoplasmă se disting corpi electronodenși, lizosomi izolați sau asociați cu lipide sub formă de corpi Gall. Mitocondriile, mai numeroase la formele tinere, sunt plasate, ca și centriolii, lângă nucleu. Membrana celulară este bistratificată. În vecinătatea ei se observă în citoplasmă microfilamente de 50—80 Å și microtubuli cu un diametru de 250 Å. Aceste formațiuni alcătuiesc sistemul citoscheletal, cu rol în mișcarea proteinelor membranei și în locomoție.

Plasmocitele au nuclei rotunzi, cu zone dense de heterocromatină, între care se disting nucleoli. Caracteristic plasmocitului este reticulul endoplasmatic de tip rugos, cu numeroși ribosomi și spații intracisternale dilatate (fig. X.4). Între lamele acestui reticul se găsesc mitocondrii. În aria arhoplasmei este plasat complexul Golgi, format din vezicule, vacuole și granule, iar alăturat se află centriolii. Corpii Russell apar ca incluziuni electronodense.

Tehnica scanning (SEM) oferă informații suplimentare ale structurilor de suprafață prezentate volumetric. Astfel, seria limfocitară prezintă microvilozități ce diferă net de formațiuni cu aspect de membrane ale monocitelor. Repartiția cantitativă a microvililor este folosită în identificarea limfocitelor B, care au microvili numeroși, și a limfocitelor T, care au membrana celulară mai netedă (fig. X.5).

CITOCHIMIE

În afară de conținutul bogat în acid ribonucleic (ARN) al citoplasmei, limfocitele au un număr redus de componenți citochimici și citoenzimatici. Numai 10% din limfocite conțin glicogen, evidențiat sub formă de granule PAS-pozitive, sensibile la diastază. Absența lipidelor neutre, a oxidazelor, peroxidazelor și fosfatazelor alcaline le deosebește de seria mieloică. Lipsa esterazelor nespecifice deosebește limfocitele de seria monocitară.

Fig. X.4. — Plasmocit — reticul endoplasmic (microscopie electronică).

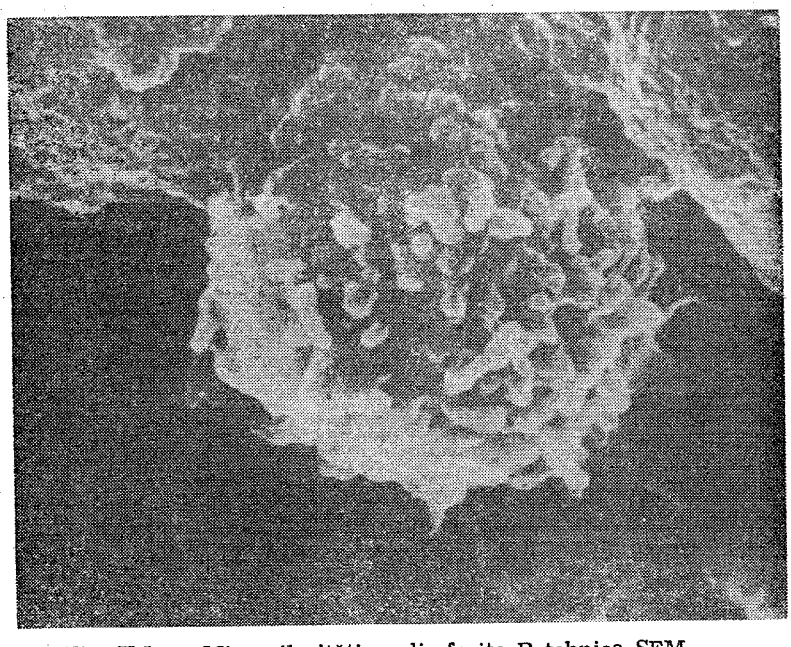


Fig. X.5. — Microvilozități pe limfocite B tehnica SEM (foto dr. Begnescu).

Sunt prezente, mai ales la formele tinere, enzimele mitocondriale, cum este SDH (succin dehidrogenaza). Enzimele lizosomiale, ca fosfataza acidă, esteraza acidă, beta-glucuronidaza, se găsesc distribuite uniform în citoplasmă, sau sub formă de structuri rotunde, alcătuind corpul Gall, propriu limfocitelor T. Deoxinucleotidil transferaza terminală (Tdt) este prezentă intranuclear în etapele timpurii ale limfopoiezei T.

Plasmocitul are citoplasma intens bazofilă la coloraţia panoptică şi pironinofilă, datorită cantităţii mari de ARN. Sub substanţa bazofilă se găseşte un complex mucoproteinic ce se colorează metacromatic cu azur de metilen, fiind evidenţiat la plasmocitele cu aspect de „flacără". Unii autori consideră prezenţa acestor mucoproteine ca fiind caracteristică plasmocitelor din măduva osoasă, diferenţiindu-le de cele din organele limfatice (25). Plasmocitele au reacţii intens pozitive pentru beta-glucuronidază şi enzimele mitocondriale, le lipsesc peroxidazele şi esterazele nespecifice.

FENOTIPUL IMUN

Noţiunea de fenotip reprezintă un sistem de identificare a subpopulaţiilor celulare până la nivel de clonă, de unde şi sinonimul de „markeri" celulari (vezi capitolul „Fenotiparea imună").

Tehnologia, care este accesibilă unor laboratoare ultraspecializate, împarte markerii în două mari categorii:

1) receptorii de suprafaţă evidenţiaţi prin captarea de diferiţi liganzi (tabelul 10.I);

TABELUL 10.I

Receptorii de membrană ai celulelor mononucleare sanguine şi testele de punerea lor în evidenţă

Receptorul pentru:	Testul de evidenţiere	Prezenţa pe celulă			
		T	B	NK/K	monocit
Hematii oaie	rozete E	+	—	±	—
Hematii şoarece	rozete M	—	+	±	—
FcIgM	rozete EAIgM	±(H)	+	—	+
FcIgG	rozete EAIgG	±(S)	±	—	+
FcIgG	rozete ES	—	+	—	+
FcIgG	rozete Ripley	—	—	+	—
IgM suprafaţă	ser fluorescent anti-IgM	—	+	—	—
Complement (C3)	rozete EAC	—	+	—	+

2) determinanţii antigenici identificaţi prin reacţii cu anticorpii specifici (tabelul 10.II).

Această împărţire este pur metodologică, în realitate toţi receptorii celulari sunt şi determinanţi antigenici, iar parte dintre aceştia

TABELUL 10.II

Antigene de diferențiere limfocitară

CD	Specificitate celulară	Etapă matur.	Structură	Funcții
1	2	3	4	5
1a	timocite cort. și Langerhans	preT III	asoc. b2 microglob.	—
2	panT timocite	preT I	LFA_2, rec. LFA_3, rec. HO	cale activare T, ligand
3	T mature	preT III	asoc. TCR = rec. antig.	cale activare T, semnale intracelulare
4	T helper	preT II	rec. MHCII rec. HIV	mol. adez. semnale
5	panT, subset B	preT III	—	B: antic. polireact.
7	panT	preT I	rec. FcIgM	—
8	T citotoxice, T supresoare	preT II	rec. MHC I	mol. adez. semnale
10	preB, B centri germinat	preB I	endopeptidază	regl. creșterii
11a	T, B, mon, gran.	B virg.	LFA_1, rec. ICAM	ligand, recirc. limf.
11b	NK, mon, gran, T?	—	rec. C3bi	ligand, centri germinativi
11c	NK, mon, gran, subset B	—		ligand
16	NK, mon. gran.	—	rec. FcIgG III	afinitate mică, reglare complex imun
19	panB	preB I	mol. adez.	semnale intracelulare Ca^{2+} proliferare
20	panB, dendr. folicul.	preB III	fosfoproteină	semnale — activare
21	B matur	B matur	rec. C_3d, rec. EBV	proliferare, activare
22	B matur repaus	preB III	mol. adeziune	contact B-mon.
23	B activat, macrof., eozin., tr.	B virg.	rec. FcIgE rec. citokine	maturare, proliferare B
25	T activ. B activ. mon.	activare	rec. IL-2	semnale activare
29	T B mon.	preT II	izoformă CD45 lanț b VLA	T inductor help mol. adeziune
32	B mon. gran, eozin.	—	rec. FcIgG II	afinitate mică, reglare compl. imune
34	stem limf., mon. miel. stromă	preB	glicoproteine ac.	anti-adeziune li.
38	stem, timocite, T activ. plasmocit	preT I	—	proliferare
43	stem li. miel., stromă, endoteliu	MO	leukosialin	semnale intracelulare
44	B memorie	preB III	mol. adeziune	recirculare B
45	antig. com. leucocitar	preB II	tirosin-fosfatază	semnale

(Continuarea tabelul 9.II)

1	2	3	4	5
45Ra	T, B, mon.	preT III	tirosin-fosfatază gr. mol. 220KD	T induct. supres.
45Ro	T memorie	T act.	„ gr. mol. 180kD	memorie im.
56	NK subset T_C	—	N-CAM mol. adez.	liza
58	NK	—	LFA_3/rec. LFA_2	mol. adeziune
71	stem, preT, preB, plasmocit	MO	rec. transferin	proliferare
HLA D/DR	B, mon, gran, T activat	preB I	2 lanțuri glico-proteice	interacțiune T reglare răspuns imun

pot avea rol de receptor. În funcție de prezența lor selectivă pe diferitele subgrupuri limfocitare, se disting mai multe categorii de markeri:

1) markeri panantigenici, comuni, tuturor subtipurilor limfocitare din cele două mari grupe B și T, indiferent de etapa de maturare;

2) markeri de maturare, care se sintetizează și represează succesiv în timpul ontogeniei limfocitare;

3) markeri de activare, care se exprimă în cursul răspunsului imun.

Se identifică, astfel, grupele limfocitare majore B și T, etapa lor de diferențiere și subgrupele diferite funcțional. Nu totdeauna însă există un paralelism strict între marker și funcție. Dovada sigură de funcționalitate este furnizată de testele funcționale *in vitro*. Interpretarea fenotipului imun trebuie să țină seama de specificitățile comune ale unor markeri cu celule din alte linii hematopoietice.

Un aspect important îl reprezintă desimea și distribuția topografică a unui marker, ce se modifică în cursul diferențierii. În funcție de această distribuție, sub influența liganzilor bivalenți, unii markeri (sIg, R—C′) prezintă motilitate în planul membranei cu formare de „capușon". Structurile citoscheletale inframembranoase, ce asigură această motilitate, variază cu tipul și maturația celulară. Inducerea capușonului poate fi modificată în patologie: absentă în leucemia limfatică cronică, accelerată în leucemia cu celule păroase *(hairy cells)* (4).

GRUPELE LIMFOCITARE

Datorită diferențelor morfologice, citochimice, infrastructurale, fenotipice și funcționale, limfocitele au fost grupate în trei mari categorii.

Limfocitele B provin din echivalentele tisulare bursale, au morfologie tipică de limfocit agranular, cu infrastructură săracă. Membrana are numeroase microvilozități, vizibile prin tehnicile TEM și SEM, iar structural conține Ig de suprafață. Sunt identificate prin panantigene B.

Activarea și diferențierea lor terminală spre plasmocit conduc la schimbări morfologice și structurale ce exprimă funcția de sinteză și secreție de anticorpi, asigurând imunitatea umorală (vezi fig. X.4).

Limfocitele T derivate din timus cuprind majoritatea formelor mici agranulare, parte având corpi Gall ca și unele granulare. Acestea reacționează pozitiv pentru enzime lizosomale. Clasic, se identifică prin rozetare E și cu panantigene T (fig. X.6),

Limfocitele „null" sau nonB, nonT constituie un grup heterogen ce cuprinde: progenitori hematopoietici cu morfologie limfocitară, limfocite T imature, preplasmocite, limfocite citotoxice cu activitate K sau NK. Observații atente pot deosebi unele celule cu aspect limfoid, dar cu nucleu tânăr, având rețea cromatiniană fină și densă, cu citoplasma bazofilă grunjoasă, fără halou perinuclear, și prezentând mici pseudopode. Unii autori (25) consideră că acest tip celular reprezintă celulele progenitoare medulare formatoare de colonii *in vitro*. În acest grup se încadrează și „celulele mari granulare" (LGL) ce conțin o mare varietate de organite lizosomale și formațiuni tubulare citoplasmatice. Raportul nucleo-citoplasmatic este în favoarea citoplasmei, cu numeroase granule azurofile. Asocierea activității NK *(natural killer)* cu morfologia LGL este frecventă, dar nu absolută. Majoritatea acestor celule exprimă pe membrană receptorul Fc al moleculei IgG determinat prin anticorpul monoclonal CD16. Aspecte fenotipice și funcționale mai detaliate vor fi prezentate la capitolul referitor la funcția citotoxică limfocitară.

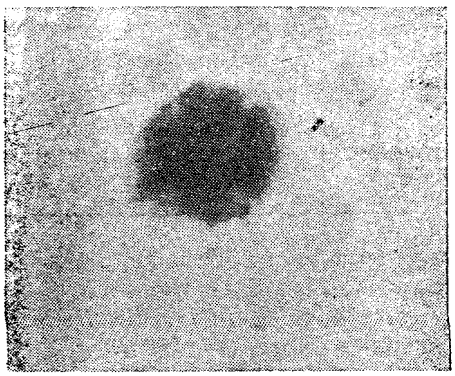


Fig. X.6. — Rozete E (preparat fixat, colorație Giemsa).

Aceste grupe de limfocite, B, T și LGL, au afinitate tisulară diferită, ocupând anumite zone bine determinate în organele limfatice. Repartiția lor cantitativă în sânge și organele limfatice este prezentată în tabelul 10.III.

TABELUL 10.III

Repartiția limfocitelor și plasmocitelor în diferite țesuturi

Țesut	Topografie	% limfocite	% T	% B	% plasmocite
Sânge		23—24	55—75	15—30	0—1
Măduvă osoasă		8—24	25	75	0—4
Timus		(timocite)	100	0	0
Ganglion limfatic	paracortical, perifolicular		60		
	centri germinativi medulari			30	20—30
Splină	teci perivasculare		45		
	centri germinativi			45	
	pulpa roșie				20—30

LIMFOPOIEZA NORMALĂ

Datorită dificultății explorării directe a țesutului embrionar cu identificarea de celule stem, studiul diferențierii limfocitare se bazează mai mult pe datele analoage din modelele animale, pe experimente cu culturi de țesuturi și pe aspecte oferite de patologia malignă. Într-adevăr, s-au constatat asemănări histologice și fenotipice între limfocitele imature și cele maligne, ceea ce justifică corelarea unor etape ale diferențierii normale la omologii maligni din diferite tipuri de leucemii acute limfoblastice și limfoame non-Hodgkin (13). În acest fel, posibilitatea de explorare a fost înlesnită având la dispoziție un număr mare de celule clonale, oprite într-o anumită etapă a diferențierii. Astfel s-au conceput modele ipotetice ale diferențierii limfocitare normale (27). Părerile cercetătorilor variază însă, între a susține validitatea acestui concept sau în a sublinia ponderea modificărilor genetice și fenotipice induse de transformarea leucemică.

Tehnicile noi de studiu celular multiparametric prin citometrie în flux, ca și cele de sortare celulară, permițând studierea unui număr mic de celule dintr-un țesut, au reușit să caracterizeze fenotipic celulele precursoare din țesuturile embriofetale. Comparându-se aceste date cu modelele ipotetice, s-au precizat anumite etape ale procesului de diferențiere limfocitară.

Dezvoltarea embriofetală a țesutului limfatic. Țesutul limfatic se dezvoltă din mezenchimul embrionar. În sacul vitelin, se formează rudimentele vaselor limfatice, în care mezenchimul alcătuiește stroma. Aceste celule mezenchimale, dotate cu pluripotență hematopoietică, migrează în rudimentele de ficat între a 8-a și a 9-a săptămână de gestație. Ele populează apoi (12 săptămâni) măduva osoasă și în urmă splina (20 de săptămâni). În aceeași perioadă se dezvoltă timusul din pungile branhiale III și IV, inițial ca un organ epitelial care va fi populat cu celule progenitoare limfocitare migrate din măduva osoasă.

Între lunile a 3-a și a 7-a intrauterine, ficatul, posibil și splina, dețin funcția limfohematopoietică principală. După acest interval, limfopoieza B este preluată de măduva osoasă. În continuare, se dezvoltă splina și ganglionii limfatici, care vor asigura limfopoieza și la adult.

În ficatul fetal s-au identificat cele mai tinere celule precursoare B. Ele au aspect de limfocite mari, cu fenotip: Tdt intranuclear, CD10+, CD19+, pe suprafață și CD22+ intracitoplasmatic. Sub acțiunea citokinei IL-7 secretate de celulele stromale, ele își dezvoltă receptorii respectivi și se diferențiază până la exprimarea IgM cu densitate mică pe membrană. Coexpresia IgD se constată ulterior, după 14 săptămâni. Se pare că în ficat secvența fenotipică a diferențierii limfocitare este diferită de cea din măduva osoasă și din splina fetală. La fătul de 4—5 luni de dezvoltare intrauterină se descrie o subpopulație de limfocite B aparte, cu fenotip: CD5+, DR+, CD19+, CD20+, sIgM+ și sIgD+, care cuprinde peste 30% din limfocitele splenice și este prezentă și în ganglionii limfatici și amigdale. La vârsta adultă această subpopulație se regăsește mai slab reprezentată .

Sistemul imun se maturează în timp, astfel că în perioada perinatală răspunsurile imune sunt aparent deficitare, nou-născutul utilizând anticorpii IgG materni până la 6 luni după care crește concentrația IgG proprii. Primii anticorpi de tip IgM secretați ating nivelul serio de la adult numai după primul an de viață. Se pot induce răspunsuri B dependente de T față de antigeni proteici, iar după vârsta de 2 ani se realizează și răspunsuri față de antigenii polizaharidici. Posibilitatea secreției de IgG și IgA anticorpice este mai tardivă, atingând valorile normale de la adult abia între 7 și 14 ani.

Limfopoieza la adult. Procesul de diferențiere și maturare de la celulele stem la limfocitele B și T se face după programe similare privind transcripția și translația genetică. O pondere importantă în inițierea și condiționarea acestor programe au interacțiunile complexe stabilite între elementele celulare și umorale ce alcătuiesc micromediul limfopoietic.

Esențial este contactul direct al celulelor stem cu celulele stromei. Acestea din urmă produc și acumulează factorii de creștere, prezentându-i sub formă biologic activă.

Celulele stromale provin din mezenchim, ele dețin un potențial multiplu de dezvoltare, spre adipocite sau osteoblaste. În măduva osoasă adultă ele sunt reprezentate prin: celule fibroblastice, endoteliale, posibil și macrofage (18).

Ele secretă numeroși factori, dintre care s-au identificat molecule de adeziune de tip N-CAM *(neural-cell adhesion molecule)* și diferite citokine: IL-3, IL-4. Se știe că în procesele de proliferare și de diferențiere celulară, un rol esențial îl au fenomenele de aderare celulară, alături de reglarea pozitivă sau negativă a citokinelor. Contactele intercelulare se stabilesc prin intermediul antigenelor de suprafață, care funcționează fie ca receptori pentru citokine sau pentru diferiți liganzi ce intervin în acțiunile celulare, fie sunt enzime ce se implică în transmiterea semnalelor primite, prin membrana celulară pe diferite căi metabolice (23). Antigenele de suprafață se exprimă secvențial în cursul ontogeniei, dovedind existența unor etape distincte ale diferențierii limfocitare.

Celulele stromale și micromediile corespunzătoare diferă în funcție de țesut. Astfel, măduva osoasă reprezintă micromediul specific pentru limfocitele B, iar timusul are același rol pentru limfocitele T. Măduva osoasă și timusul alcătuiesc *organele limfatice primitive sau centrale,* unde are loc diferențierea de la celulele precursoare până la limfocitele „virgine" sau de „repaus", care au căpătat în acest proces imunocompetența specifică. Această fază este *independentă de prezența antigenului.* Limfocitele sunt eliberate în circulație, de unde migrează în ariile bursosau timodependente din *organele limfatice secundare sau periferice:* ganglioni limfatici, splină, amigdale, țesut limfatic asociat mucoaselor din aparatele digestiv, respirator, genitourinar. În aceste zone, în urma *stimulării antigenice,* se completează maturarea limfocitelor activarea lor cu expansiune clonală și cu manifestarea funcțională.

Sistemul de celule stem din măduva osoasă deține pluripotență evolutivă, incluzând și seria limfocitară. Denumite „poliblaști" de către Maximow, ele se caracterizează prin proprietatea de autoreînnoire, alături de cea de diferențiere. Ele formează colonii hematopoietice în condițiile

culturii în agar, fiind definite astfel ca aspect funcțional. În prezent, proprietățile lor sunt cunoscute prin tehnicile de sortare celulară în baza markerilor de suprafață și prin teste de legare de liganzi. Se constată astfel că toți precursorii poartă antigenul comun leucocitar CD45+, alături de HLA-DR+, CD34+ și CD71+, iar intranuclear au reacție pozitivă pentru TdT.

Diferențierea și maturarea limfocitelor. Procesul de diferențiere celulară este inițiat prin modificări la nivel genic ce codifică sinteza anumitor proteine specifice ce realizează aspecte fenotipice și morfofuncționale corespunzătoare. Cu toate că fenomenele se produc secvențial, procesul este continuu, unidirecțional. Astfel că stadiile de diferențiere celulară sunt greu de delimitat, dar în funcție de anumiți parametri se admit în mod convențional etapele de: (1) progenitori, (2) precursori limfocitari, (3) limfocite mature virgine sau de repaus, (4) limfocite mature activate de antigen și (5) diferențierea terminală cu exprimare funcțională. Procesul de maturare completează diferențierea, referindu-se în principal la modificările ce condiționează capacitatea funcțională celulară.

Diferențierea și maturarea limfocitelor B. Limfocitele *progenitoare B* provin din celula stem limfoidă, sunt localizate în ariile extravasculare subendoteliale ale măduvei osoase (30). Sunt celule mari, cu aspect tânăr, caracterizate printr-o mare capacitate de proliferare, în cursul căreia se produce rearanjarea genelor ce codifică regiunile variabile ale moleculelor de Ig, receptor de recunoaștere, stabilind specificitatea anticorpică (fig. X.7).

Familiile de gene ce codifică lanțurile de Ig se află pe cromosomi diferiți: pe cromosomul 14 sunt situate genele pentru lanțuri grele H, pe cromosomul 2 lanțurile ușoare kappa, iar pe cromosomul 22 lanțurile ușoare lambda. Cascada rearanjărilor începe cu genele regiunilor variabile: segmentele V — variabil, J — joncțiune, D — diversitate ale lanțurilor grele, prin procese succesive de translocație cu excludere alelică. Secvențele respective se preiau de către ARN transcriptional, iar mesajul este translatat ca produs μ al lanțului greu. Acesta are doi exoni diferiți, unul pentru molecula Ig de suprafață, altul pentru Ig secretată. Anumite mecanisme de control împiedică sinteza lanțurilor grele cu specificități diferite în aceeași celulă.

Etapa de *precursor B* este indicată de prezența lanțului μ intracitoplasmatic (fig. X.8).

În acest stadiu, de celulă mică postmitotică, are loc treapta următoare a rearanjării genice, întâi pentru lanțul kappa, apoi pentru lambda, după aceleași secvențe ca cele efectuate la lanțurile grele. Expresia fenotipică corespunzătoare rearanjărilor genice este reprezentată de antigenele de suprafață. Dintre acestea, cele cu rol activ în procesul de diferențiere sunt sintetizate sau represate succesiv pe parcursul acestui proces. În prezent se cunosc date incomplete asupra imunfenotipului, sau asupra rolului fiziologic al acestor determinanți în perioadele timpurii ale ontogeniei limfocitare. Nadler (14) propune un model de diferențiere a precursorilor B:

— etapa I: coexpresia HLA—DR+, CD19+, CD10+, cu rol în transducerea semnalelor de reglare a proliferării;

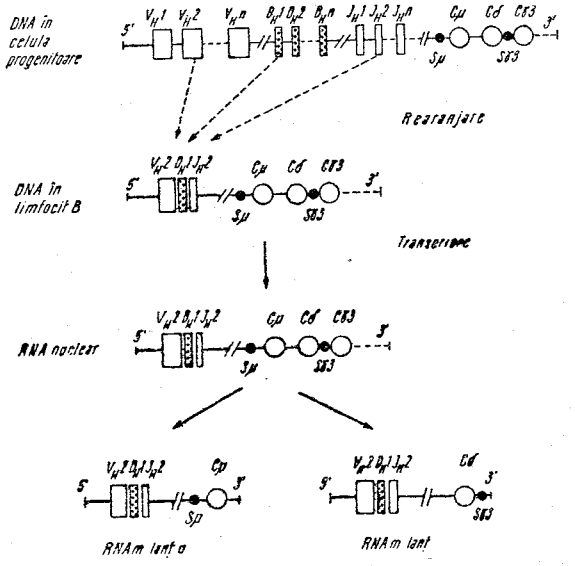


Fig. X.7. — Rearanjarea genelor ce codifică sinteza Ig.

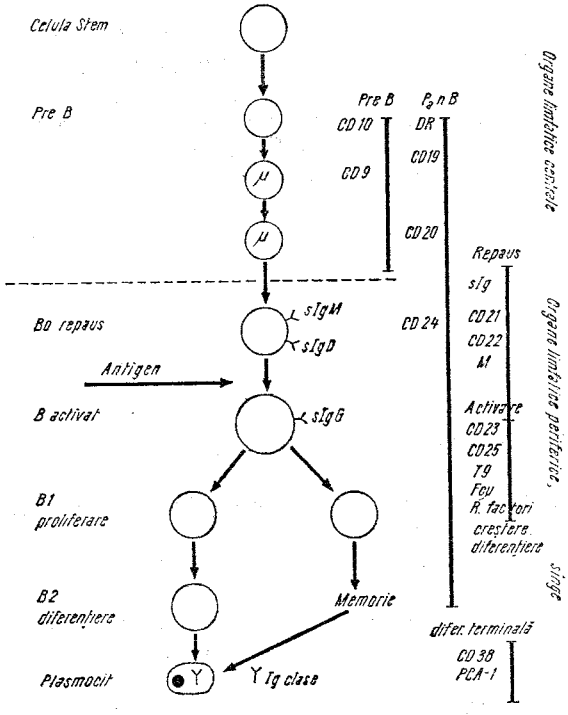


Fig. X.8. — Ontogenia limfocitelor B (schemă).

— etapa a II-a: se adaugă antigenul CD34+ comun cu progenitorii mieloici, CD22+ intracitoplasmatic şi diferite panantigene B de natură enzimatică sau ca receptori pentru factori de creştere;

— etapa a III-a: CD10+ este represat, se sintetizează intracitoplasmatic lanţul μ al Ig, se exprimă pe membrană CD22+ cu rol în transducţia semnalelor pe calea sIg, apoi CD20+ ce reglează fluxul calcic intracelular. Panantigenele nou-formate iau parte la contactele cu endoteliul vascular, au rol în maturarea limfocitelor B. Limfokina IL-3 produce semnalele de proliferare în aceste etape (31).

În etapa de *limfocit B virgin sau de repaus* se produce procesul de maturare independent de prezenţa antigenului. La nivel infrastructural are loc sinteza celor două tipuri de lanţuri, grele şi uşoare pe poliribosomi diferiţi, cu asamblare în cisternele reticulului endoplasmic. Apoi are loc transportul prin veziculele aparatului Golgi la membrana celulară, unde se exprimă ca sIgM, fără a avea capacitate de secreţie de IgM. Fenotipic se notează apariţia moleculelor de adeziune CD11a/18+ ce condiţionează recircularea limfocitară, a receptorilor pentru complement (C3d) CD21+ şi a altor panantigene.

Are loc pregătirea funcţională a limfocitului B prin sinteza receptorilor pentru factori de creştere şi a celor implicaţi în formarea complexelor cu antigenul. Limfocitele B virgine sunt mici, au cromatina densă, nu se mai divid. Măduva osoasă generează zilnic 10^9 limfocite B, având capacitatea maximă de a produce 1 milion de clone B, cu specificităţi anticorpice diferite. Trecând în circulaţia sanguină, receptorii pentru antigen ai limfocitelor B virgine fac tranziţia spre maturare, câştigând şi IgD alături de IgM sintetizat în măduva osoasă. Se exprimă şi cel de-al doilea receptor pentru complemet (C3b) CD35+, receptorul pentru porţiunea FcIgG, precum şi alte antigene: CD37+, CD39+, CDw75+, CD76+. Din sângele periferic, limfocitele B virgine se distribuie conform tropismului în ariile „bursodependente" din organele limfatice periferice.

În organele limfatice periferice, întâlnirea cu antigenele determină etapa *maturării limfocitelor B*, dependentă de antigen, ce se caracterizează prin trei procese: (1) recunoaşterea antigenului, (2) activarea, (3) diferenţierea terminală.

1) Recunoaşterea antigenului se face prin receptorul de recunoaştere care pe suprafaţa limfocitelor B este IgD ce exprimă un singur tip de lanţ uşor fie kappa sau lambda, având un allotip, idiotip şi un singur loc de combinare cu antigenul (4). Aceeaşi identitate structurală se păstrează şi la Ig anticorpică secretată de plasmocitele corespunzătoare. Prin regiunile variabile ale moleculei de Ig, limfocitul B recunoaşte structuri complementare ale determinanţilor antigenici. Procesul de recunoaştere depinde de natura antigenelor, ce poate fi de două categorii: antigene „timoindependente" şi „timodependente". Primele au structuri repetitive recunoscute direct de limfocitele B, realizând răspunsul în imunitatea naturală. Antigenele „timodependente" sunt alcătuite din doi determinanţi, purtător şi haptenă, faţă de care limfocitele B răspund prin cooperare cu limfocitele T *helper* şi macrofage în cadrul imunităţii dobândite.

Astfel, limfocitele B pot recunoaşte antigene în stare nativă sau prin intermediul celulelor prezentatoare de antigen (APC) care captează, pre-

lucrează și prezintă pe suprafață porțiuni antigenice asociate cu molecule codificate de genele MHC II (tabelul 10.IV).

2) Activarea este un fenomen complex ce se declanșează în urma legării antigenului de receptorul B de recunoaștere. Acest contact determină și secreția de IL-1 de către celulele prezentatoare de antigen, ce

TABELUL 10.IV

Tipuri de celule prezentatoare de antigen

Denumirea celulei	Țesut	Fagocitoză	Receptori Fc/C_{3+}	HLA—DR+	Prezentare către limfocite
Macrofage din zona marginală	splină, ganglioni	+	+	—	B
Celule dendritice foliculare	centrii germinativi	—	+	—	B
Celule dendritice interdigitate	aria T organe limfatice secundare	—	±	+	T
Celule Langerhans	piele	—	±	+	T
Monocite/macrofage	zona medulară	+	+	+	T+B
Celule interdigitate	timus	—	—	+	timocite

stimulează limfocitele T_H. La rândul lor, acestea produc factorii de proliferare IL-2 și IL-4 (BCGF-1) ce influențează intrarea limfocitelor B în ciclul celular. Limfocitele B se divid rapid și produc între 5 și 15 generații de limfocite B_1-fiice. Infrastructural se produce procesul de „comutare izotipică" a receptorului de recunoaștere de la expresia IgD, IgM la altă clasă de Ig. Aceasta se realizează prin procese de hipermutație somatică asupra complexului de gene VJD rearanjate în prealabil. Fragmentele genice Cμ Cδ sunt deletate și se exprimă genele rămase în cadrul complexului VJD, ce determină sinteza receptorului de altă clasă, IgG, IgA sau IgE cu păstrarea specificității inițiale. Se produi și modificări fenotipice: pierd CD21, CD22, se exprimă receptori pentru factorii de creștere: IL-4, IL-5, transferină (CD71+), receptor de afinitate redusă pentru IL-2 (CD25+), pentru citokine (CD23+). Se sintetizează determinanți cu rol de stabilire a interacțiunilor celulare, cum sunt: CD45+, CD54+, B5, Blast-1, B7/BB1 (17). Apariția receptorului pentru IL-6, deci a capacității de interacțiune cu acest factor de diferențiere B, marchează începutul următoarei etape de diferențiere.

3) Procesul de diferențiere se face în două direcții: o diferențiere terminală cu generare de efectori B, plasmocitele cu viață scurtă, iar în altă direcție se asigură compartimentul celular B cu memorie imună.

Diferențierea terminală spre plasmocite se realizează sub acțiunea factorilor de diferențiere secretați de limfocitele T, cum sunt IL-6 (BCDF) și gamma IFN. Ei inhibă proliferarea clonelor B și induc secreția diferitelor clase Ig anticorpice. Procesul de diferențiere continuă prin modificări

morfologice şi imunfenotipice succesive, realizând etape de: imunoblast B, plasmoblast, preplasmocit şi, în final, plasmocit. Aceste celule pierd treptat antigenele B de repaus şi de activare şi sintetizează noi markeri de suprafaţă: CD38+, CD71+, CD78+PC-1, PC-2 şi PCA-1. Intracitoplasmatic la nivelul plasmocitului se află structuri specializate în vederea sintezei unei mari cantităţi de Ig anticorpice ce pot fi evidenţiate prin teste imunofluorescente.

Limfocitele B de memorie sunt generate în urma proliferării clonelor limfocitare B specifice pentru antigen în cadrul imunităţii dobândite. Ele recirculă prin sânge şi ţesuturi, iar, la un nou contact cu acelaşi antigen, pot asigura răspuns anticorpic rapid, cu afinitate de legare puternică şi eficienţă sporită, răspuns denumit secundar. Compartimentul celulelor de memorie se menţine timp îndelungat în organism, nefiind clarificat dacă ele au viaţă lungă sau se produce un proces continuu de recrutare celulară.

Diferenţierea şi maturarea limfocitelor T. Originea medulară a celulelor progenitoare, ca şi programul de diferenţiere a limfocitelor T, se produce după tipare similare cu cel al limfocitelor B. Se disting două etape:

1) diferenţierea intratimică, antigenoindependentă, în care micromediul timic induce competenţa funcţională a limfocitelor T;

2) maturarea şi activarea antigenodependentă a limfocitelor T migrate prin sânge la organele limfatice periferice, unde îşi exprimă capacitatea funcţională.

În timus se desfăşoară prima etapă de diferenţiere şi maturare a celulelor T, începută din viaţa intrauterină şi continuată la adult. *Celula progenitoare T* din măduva osoasă populează timusul. Aceste celule sunt incomplet definite în prezent.

Studiile cu anticorpi monoclonali pe ţesuturi fetale, combinate cu culturi de colonii în agar, indică asemănări între progenitorii medulari cu cei din timus. Ambele tipuri celulare conţin intranuclear Tdt, iar primul antigen exprimat este CD7+, receptor pentru FcIgM cu rol necunoscut (22). Structurile antigenice se sintetizează într-o anumită ordine, exprimându-se întâi intracitoplasmatic, apoi pe membrană. Se admite astfel secvenţa: CD3+ intracitoplasmatic, CD2+ pe suprafaţă. CD2 este receptorul pentru hematii de oaie evidenţiat în test de rozetare şi în acelaşi timp ligandul fiziologic al moleculei de adeziune LFA-3 prezentă pe celulele epiteliale din timus. Astfel se efectuează contactul timocitelor cu epiteliul timic, bogat în molecule HLA II în corticală, HLA I în medulară (21). În această etapă are loc rearanjarea genelor ce codifică receptorul T de recunoaştere antigenică TCR, prin mecanisme similare cu cele pentru receptorul Ig al liniei B. Genele ce codifică lanţurile alfa sunt plasate pe braţul lung al cromosomului 14, iar cele pentru lanţurile polipeptidice beta sunt pe cromosomul 7. Un singur rearanjament al genelor VJD asigură monospecificitatea unei clone celulare T. Apoi segmentele VJD se unesc cu regiunile C pentru a completa lanţul polipeptidic alfa sau beta. Recent s-au identificat rearanjamente ale genelor gamma şi delta ce formează al doilea tip de receptor CD3/TCR prezent pe o minoritate de limfocite T.

Activitatea proliferativă a progenitorilor timici este susținută prin funcția moleculelor CD38+, CD71+ și stimulată de citokine. Dintre acestea se știe că IL-3 reglează proliferarea pretimocitelor și a timocitelor dublu pozitive sau dublu negative pentru expresia CD4, CD8.

Celulele precursoare T *sau timocitele* se diferențiază în trei stadii (fig. X.9):

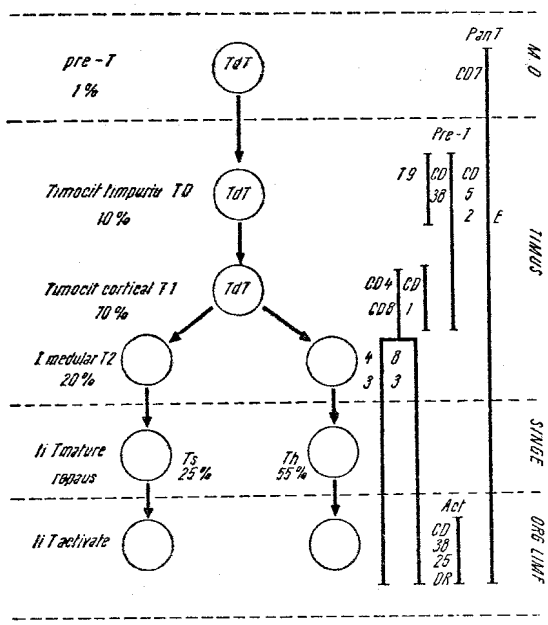


Fig. X.9. — Ontogenia limfocitelor T (schemă).

1) timocitele timpurii T_0 cuprind 5—10% din timocite, au Tdt intranuclear, CD3+ intracitoplasmatic, iar pe membrană exprimă o serie de markeri: CD38+, CD2+, CD71+. Unii cercetători susțin că aceste celule au temporar receptor pentru complement de tip C_{3bi} (CD1b+), care alături de receptorul pentru hematii de oaie (CD2+) ar defini populația dublă „D", prezentă în procentaj mic în unele situații, în sânge (29);

2) timocitele corticale T_1 sunt majoritare (70%), păstrează antigenele primei etape, minus CD71, și câștigă antigenul specific cortical CD1+ și CD29+ ca izoformă cu greutate moleculară mică a antigenului leucocitar CD45+. În funcție de expresiile antigenelor CD4+ și CD8+, majoritatea sunt dublu pozitive, dar o mică parte din cortico-timocite sunt dublu negative;

3) timocitele medulare T_2, în procent de 10—20%, pierd antigenul CD1, enzima Tdt, dar exprimă markeri de maturare: receptorul de recunoaștere a antigenului format din complexul CD3/TCR alături de CD5+, CD6+ și CD45Ra+ ca izoformă cu greutate moleculară mare. Se împart în două subpopulații în funcție de expresia moleculelor fie CD4+, fie CD8+. Ele răspund la unii stimuli (PHA) *in vitro*, dovedind un în-

ceput de competență funcțională. Procesul de diferențiere intratimică generează subpopulațiile de limfocite T funcționale care trec în circulația sanguină, însă marea majoritate (85%) a timocitelor mor *in situ*. Are loc deci un proces de selecție al clonelor T (21). Realizarea selecției timice este încă în stadiul de ipoteze.

Se pare că primul factor ce direcționează procesul de selecție este specificitatea receptorului de recunoaștere TCR căpătată în timus. Datorită diversității TCR și prin interacțiunile cu antigenii proprii codificați de genele MHC, de pe epiteliul timic, timocitele „învață" să recunoască antigenele străine și în același timp să tolereze antigenele proprii. Se prezintă câteva din mecanismele posibile ale selecției timice. Dacă se subliniază rolul primordial al specificității TCR, există două alternative: 1) TCR specific și cu afinitate potrivită pentru moleculele HLA proprii: acestea emit semnale ce dictează expresia antigenelor CD4+ sau CD8+; la rândul lor, aceste molecule fiind liganzii fiziologici CD4+ pentru HLA II, iar CD8+ pentru HLA I, stabilizează această legătură și induc semnale transmembranice complementare; ca efect se produce diferențierea și maturarea până la limfocitul T ce părăsește timusul și trece în circulație;

2) TCR nepotrivit, ce reacționează față de moleculele HLA proprii: aceste timocite vor fi selectate negativ și vor intra în apoptoză (moarte programată a celulei) *in situ*. Deleția acestor clone autoreactive este explicată de unii autori (16, 20) prin aviditatea lor de legare exagerată, alcătuind o interacțiune TCR/HLA apoi CD4+ sau CD8+ într-un mod în care se opresc semnalele de diferențiere.

Alt mecanism al selecției se bazează pe funcțiile importante în diferențiere deținute de moleculele CD45, care se prezintă prin două izoforme de timocite. Cele care au greutate moleculară mică (180 kd) cum este CD29+ ar fi deficitare funcțional, iar clonele care le exprimă, adică majoritatea timocitelor corticale (CD1+, CD4+, CD8+) vor fi deletate. Izoforma CD45Ra+ cu greutate moleculară mare (220 kd) este prezentă pe timocitele dublu negative pentru CD4 și CD8, ca și pe cele unic pozitive pentru acești antigeni, are capacitate funcțională și va genera limfocite T mature. În contextul acestei ipoteze, timocitele dublu negative CD4—CD8— ar fi precursorii celor două subgrupe limfocitare CD4+ și CD8+.

În procesul selecției se discută și relațiile între cele două căi de activare: prin CD2+, prin CD3/TCR+. Aceste mecanisme sunt completate prin reglarea idiotipică și prin producerea limfocitelor T supresoare ale autoreactivității (24).

Migrația celulară din timus cuprinde timocitele medulare mature și o proporție nesemnificativă de timocite imature.

Funcțiile timusului variază cu vârsta (8). Astfel, colonizarea organelor limfatice periferice cu limfocite T este maximă la făt și se reduce după naștere. Această reducere continuă în mod progresiv la vârsta adultă. Limfopoieza T la adult se produce mai mult la nivelul organelor limfatice periferice, fiind reglată de factorii umorali timici ce acționează la distanță în zonele timodependente ale acestor organe. Acești factori au funcții asemănătoare hormonilor (hormoni timici) și nu au specificitate de specie. S-au izolat în jur de 20 factori hormonali din țesutul

timic sau din sânge, cum este timopoietina, cu acțiune limitată la anumite etape ale diferențierii liniei T. Ei sunt produși de celulele epiteliale ale timusului, dar modul lor de acțiune și funcția lor nu este încă bine precizată.

În sângele periferic timocitul matur devine *limfocit matur T de repaus*, numite și/sau *virgine*, ce deține competența funcțională T cu cele două caractere:

1) recunoașterea antigenului în cadrul restricției MHC;

2) toleranța antigenelor proprii.

Limfocitele T nu se divid în sânge și pierd astfel determinantul CD38. Fenotipul matur cuprinde: CD2+, CD3/TCR+, CD5+, CD6+ și fie CD4+, fie CD8+. Expresia ultimelor două antigene împarte limfocitele în două subpopulații cu profil funcțional diferit: limfocitele T helper/inducer CD4+, reprezentând 55% tin limfocite și limfocitele T supresoare/citotoxice CD8+, 25%. Limfocitele T mature virgine CD4+ exprimă antigenul leucocitar prin izoforma CD45Ra cu greutate moleculară ce induce supresie.

Din sânge, limfocitele T virgine migrează în zonele timodependente din organele limfatice periferice, cum sunt aria paracorticală din ganglionii limfatici și tecile periarteriolare din splină.

În organele limfatice periferice, după stimulare antigenică, procesul diferențierii continuă prin activare, ca în final să exprime funcțiile efectorii. Exprimarea funcțională a diverselor clone limfocitare T este condiționată de modul lor de activare, care depinde de tipul *receptorului de recunoaștere* (31). În prezent se cunosc trei receptori diferiți de recunoaștere ai antigenului.

1) Receptorul clasic, prezent pe majoritatea limfocitelor T, este format din TCR, un heterodimer polimorfic cu două lanțuri polipeptidice alfa și beta; el este legat necovalent de trei molecule glicoproteice ce alcătuiesc complexul CD3 nepolimorfic. Diversitatea complexului TCR/CD3 se dobândește în cursul ontogeniei timice. Studii cu anticorpi monoclonali au dovedit că TCR este locul de legare atât al antigenului, cât și al complexului MHC; iar structura CD3 are rol în transducția semnalelor prin membrană, pe calea metabolică fosfotidil/inositol/Ca. Spre deosebire de receptorul Ig al limfocitelor B, receptorul TCR/CD3 nu poate recunoaște antigenul nativ, ci numai fragmentele lui peptidice prelucrate de celulele prezentatoare de antigen. Acestea le expun pe suprafață în asociație cu moleculele codificate de genele MHC. Așadar limfocitul T nu poate recunoaște antigenul decât în context cu molecule de clasa I sau II ale MHC. El are deci o dublă specificitate (pentru antigen și pentru MHC). Legarea antigenului de complexul TCR/CD3 este limitată de recunoașterea acelor molecule codificate de genele MHC similare cu cele contactate în cursul ontogeniei timice; are loc deci o „restricție" legată de MHC. Limfocitele CD8+ (citotoxice) recunosc antigenul în asociație cu structurile codificate de MHC I (HLA—A, B, C) care sunt prezente pe toate celulele din organism; iar limfocitele CD4+ (helper și de hipersensibilitate) recunosc structurile MHC II (HLA—DP, DQ, DR) exprimate de macrofage, granulocite, limfocite B. Receptorul TCR/CD3 se exprimă tardiv în ontogenia timică, la nivelul limfocitelor funcționale. În genera-

rea limfocitelor T de memorie acest receptor nu suferă procese mutaţionale noi.

2) Al doilea receptor de recunoaştere al antigenului este un antigen funcţional leucocitar, LFA2, indicat de CD2+. Structural face parte din superfamilia de Ig, are trei epitopi diferiţi, dintre care unul este receptorul pentru hematii de oaie şi receptor pentru molecula LFA3, cu rol de aderare. Ceilalţi epitopi mediază activarea alternă a limfocitelor T. Legarea structurii CD2+ de LFA3 de pe alte celule, mediază aderarea la epiteliul timic, creşte activitatea de legare pe celulele stimulatoare sau pe celule ţintă. Receptorul CD2+ este sintetizat în prima etapă a diferenţierii timice înaintea complexului TCR/CD3 (29).

3) Un subgrup diferit de limfocite T poartă un al treilea receptor de recunoaştere al antigenului format dintr-un heterodimer cu lanţuri polipeptidice gamma şi delta, asociat cu CD3 (26). Acesta este produs timpuriu în ontogenia timică, fiind selectat prin alte antigene decât complexul MHC. Din timus aceste limfocite migrează spre epiderm, mucoasele digestivă şi pulmonară şi, posibil, spre ganglioni şi splină, constituind numai 0,5—10% din limfocitele circulante. Aceste celule au fenotip dublu negativ pentru CD4, CD8, exprimă CD3+ şi receptor FcIgG, au funcţie citolitică şi produc limfokine: IL-2, IL-4, IFNγ. Este posibil ca aceste limfocite T gamma/delta să reprezinte prima linie de supraveghere tisulară apărută în ontogenie.

Activarea limfocitelor T virgine se produce *in vivo*, odată ce un antigen se fixează pe receptorii specifici de recunoaştere şi comportă o serie de procese biochimice, metabolice, fenotipice şi morfologice.

1) Calea prin receptorul TCR/CD3 este iniţiată de recunoaşterea antigenului asociat cu MHC, determină răspuns antigeno-specific şi este condiţionată de interacţiuni celulare cu macrofage ce secretă IL-1 şi cu limfocitele T_H ce poartă molecule CD4+, CD11a+. În urma procesului de captare a antigenului, complexul TCR/CD3 este desprins de pe membrană împreună cu determinantul CD4+ în procesul de modulare. Semnalele transmise de moleculele CD3 şi CD4 intracitoplasmatic, induc sinteza de IL-2 şi exprimarea receptorilor alfa şi beta pentru IL-2. Legarea acesteia de receptorul respectiv conduce la sinteza antigenului CD71 şi mediază proliferarea clonală a limfocitelor T. După încetarea stimulării antigenice, se reduc receptorii pentru IL-2, reapare TCR/CD3 pe suprafaţă şi limfocitul încetează să mai prolifereze.

2) Calea de activare alternă, antigenoindependentă, este mediată de moleculele CD2+. Este necondiţionată de macrofage sau IL-1, dar este dependentă de IL-2. Această cale reprezintă mecanismul de recrutare celulară, a producerii de limfokine şi a amplificării unui răspuns imun când stimularea antigenică nu este persistentă. Receptorul TCR/CD3 reglează funcţia receptorului CD2, inhibând o activare nespecifică în favoarea proliferării celulare antigeno-specifice, iar receptorul CD2, prin mecanismul de adeziune celulară, creşte răspunsul dependent de antigen.

Limfocitele T activate exprimă, pe lângă fenotipul matur, noi markeri de activare: CD25+, DR+, CD38+, CD69+, CD71+, CD29+. Aceştia transmit semnalele transmembranice în urma cărora limfocitele proliferează şi se diferenţiază în celule cu funcţii efectorii. Acestei etape

îi corespunde aspectul de imunoblast T, care își dezvoltă structuri biochimice specializate: aparat Golgi, lizosomi, corpi multiveziculați.

Imunoblaștii proliferează intens, iar după 5—10 cicluri mitotice, celulele fiice nu mai proliferează, sunt mici, cu aspect de limfocite T mature. Ele urmează două direcții evolutive diferite: unele formează compartimentul de *limfocite T efectoare* ce dețin funcții citotoxice sau funcții de hipersensibilitate tardivă, iar altele devin *limfocite T de memorie imună*. Termenul de memorie imună este folosit pentru a desemna răspunsul imun rapid și crescut al unor limfocite față de agenți patogeni întâlniți anterior. Limfocitele T de memorie circulă în întreg organismul realizând un sistem de protecție imună. Ele pot fi deosebite de limfocitele T virgine datorită densității mari a markerilor de suprafață. Dintre aceștia se remarcă expresia panantigenelor leucocitare CD45+, care pe limfocitele T virgine se exprimă prin izoforma CD45Ra+ inductoare de supresie, iar pe limfocitele T CD4+ de memorie, prin izoforma cu greutate moleculară mică CD45Ro+ inductoare de help și de răspuns chiar la concentrații mici de antigene. Totodată limfocitele T de memorie au concentrații mari de molecule cu rol în adeziunea intercelulară și de substraturi, ca CD2+, CD11a+. Majoritatea acestor molecule servesc și ca molecule de activare. Limfocitele T de memorie sunt localizate mai mult în țesuturile nelimfoide: piele, mucoase respiratorii și intestinală, predomină în leziunile inflamatorii, fiind deci mai frecvente la nivelul unor posibile întâlniri cu antigenul în vederea unui răspuns imun rapid.

Culturile in vitro cu mitogeni, autoalloantigeni, anticorpi monoclonali, pot ilustra secvențele procesului de activare limfocitară și a celui de maturare a unor subgrupe de limfocite (tabelul 10.V).

TABELUL 10.V

Teste funcționale in vitro

Test	T_h	T_s	T_o	B	NK	K
Transformare blastică cu PHA	⊕	—	±	—	—	—
Transformare blastică ConA	—	⊕	—	—	—	—
Transformare blastică LPS*	—	—	—	⊕	—	—
Transformare blastică PWM	⊕	—	—	⊕	—	—
Transformare blastică PPD	⊕	—	—	⊕	⊕	—
Reacție mixtă limfocitară	+	—	+	—	—	—
Test helper cu PWM	+	—	—	+	—	—
Test supresor cu ConA	—	+	—	—	—	—
Test NK	—	—	—	—	+	—
Test ADCC	—	—	—	—	—	+

* La șoarece.

Fitohemaglutinina (PHA), mitogen tipic pentru limfocitele T, stimulează nespecific prin legare de CD3 de mai multe clone T, fără participarea MHC, dar necesită anumiți factori secretați de celulele accesorii cum sunt monocitele, granulocitele. Modificările morfologice și fenotipice se urmăresc secvențial: în primele 2 zile se exprimă CD25+, se reduc CD45R. A 4-a zi apar CD70, CD71, CD9, CD38+ și densitate mare CD29+; la 10 zile se exprimă DR+. Concomitent se produc modificări morfologice similare activării *în vivo:* în primele ore de cultură nucleolii cresc în dimensiune, se produc modificări citochimice. După 3 zile cresc grupe de ribosomi, se dezvoltă reticulul endoplasmatic rugos, lizosomii și complexul Golgi (fig. X.10).

La nivel metabolic procesele de proliferare, diferențiere și activare celulară se realizează prin diferite căi biochimice ce pot varia în funcție de tipul celular, exprimarea receptorilor și natura factorilor de creștere ce-i influențează (23).

Declanșarea reacției este produsă în urma legării factorilor de creștere de receptorul corespunzător de pe suprafața limfocitului. Se produce un semnal transmembranic ce duce la modificări conformaționale ale proteinelor din membrană și la activare de enzime cu modificări ulterioare de substraturi.

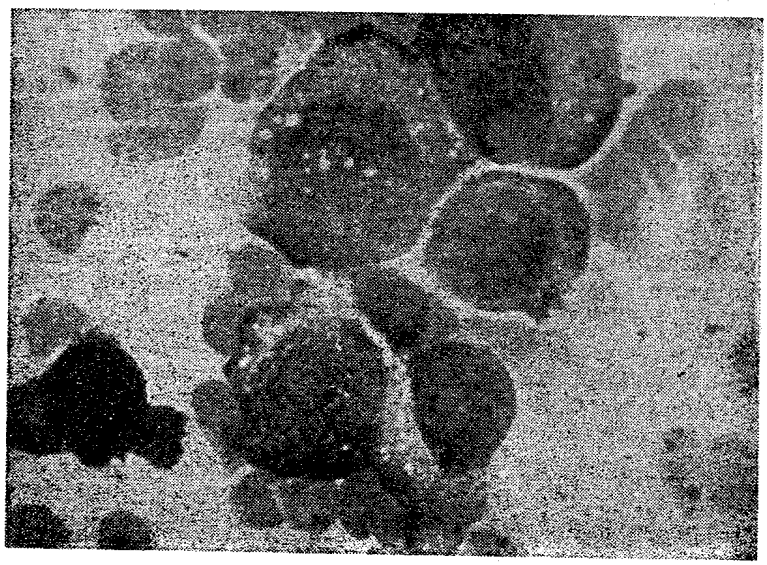


Fig. X.10. — Imunoblaști *in vitro.* Cultură de sânge la 3 zile, cu stimulare PHA (colorație May-Grünwald-Giemsa).

Una din căile de transducție a semnalului intracelular se face prin fosfotidil-inositol și flux calcic. Implică activarea unei fosfolipaze ce rupe un substrat lipidic al membranei, eliberează două componente: inositol trifosfat și diacilglicerol. Primul eliberează ionii de calciu intracelular, al doilea activează protein kinaza C. De aici semnalele se transmit în nucleu pe cale neelucidată încă și induc declanșarea proliferării.

CIRCULAȚIA ȘI DURATA DE VIAȚĂ A LIMFOCITELOR

Spre deosebire de celelalte celule hematopoietice, limfocitele au capacitatea de recirculare: ele părăsesc vasele sanguine, se distribuie la nivel tisular, de unde reintră în circulație (fig. X.11).

Procesul se produce de mai multe ori fiind independent de antigen.

În organismul adult, majoritatea limfocitelor (98%) circulă și se află în organele limfatice și țesuturi și numai 2% se găsesc în sânge. Dar

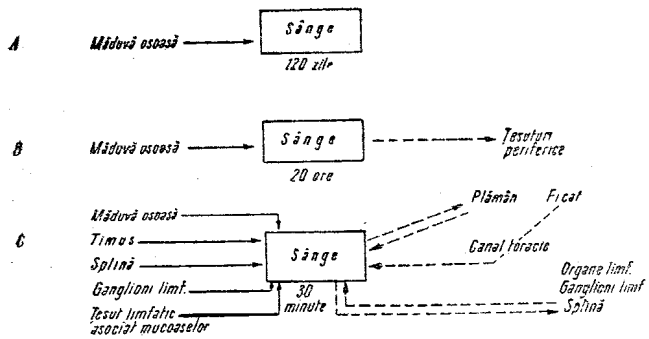


Fig. X.11. — Cinetica celulelor hematopoietice. A — eritrocite; B — granulocite; C — limfocite.

având un timp mediu de 30 min. de tranzit prin sânge, rezultă că pe zi majoritatea limfocitelor (500×10^9) trec prin sânge (15, 32). În circulație se găsesc linii limfocitare distincte și în cadrul fiecărei linii sunt limfocite cu diferite grade de maturare și competență funcțională. Cu toată heterogenitatea lor și marele trafic prin sânge, numărul limfocitelor se menține constant ceea ce denotă existența unui mecanism de reglare a migrării lor, asigurând o apărare imună eficientă. Fiecare tip celular este reglat diferit; astfel limfocitele B părăsesc mai repede sângele și revin mai tardiv (via canalul toracic) decât limfocitele T. Căile de migrație ale limfocitelor virgine, de memorie și efectoare, sunt de asemenea diferite: pe când cele virgine circulă în tot organismul, cele de memorie sunt restrânse la anumite regiuni ale corpului, iar căile celulelor efectoare sunt și mai restrânse.

Se constată și o preferință a limfocitelor pentru organele limfatice sau țesuturile unde ele migrează. Astfel, cele din ganglionii limfatici se întorc tot în ganglionii limfatici, iar cele din țesutul limfatic asociat mucoaselor vor migra în zone similare. Diseminarea și recircularea limfocitelor T de memorie în întreg corpul conferă o caracteristică importantă memoriei imunologice, aceea că ea este sistemică: un răspuns imun în orice parte a corpului duce la un răspuns tip de memorie la contactul cu antigenul din alte țesuturi. Limfocitele T virgine au viață lungă și recirculă, iar limfocitele B care părăsesc măduva osoasă ca celule „virgine" și se maturează în sânge, trăiesc cam 5 zile, în care timp ele migrează în organele limfatice periferice. Aici, în lipsa unei stimulări antigenice, ele degenerează rapid. Dacă însă sunt stimulate, se diferențiază în celule efectoare, plasmocite sau celule de memorie. Plasmocitele ajung în medulara ganglionilor limfatici, în pulpa roșie, splenică sau în submucoasa

și lamina propria a tractului digestiv și respirator, unde secretă anticorpi și după câteva zile mor. Limfocitele de memorie imună se acumulează în organele limfatice pe care le părăsesc după scurt timp, intră în circulație unde repetă circuitul prin organele limfatice, țesuturi, în perioade ce pot însuma 5—10 ani și când întâlnesc un antigen specific se activează.

Datorită heterogenității limfocitelor și a multiplelor condiții care afectează compoziția subseturilor de limfocite din sânge, modificările lor din sânge nu oglindesc alterările compoziției limfocitelor din organele limfoide și nelimfoide.

Căile majore ale recirculației limfocitelor cuprind calea hematogenă și cea limfatică (fig. X.12).

Din sânge, limfocitele pătrund, în primul rând, în organele limfatice periferice (splină, ganglioni, țesut limfatic asociat mucoaselor) și într-un grad mai redus spre țesuturile nelimfoide. De la țesuturi și mucoase, limfocitele circulă spre ganglionii limfatici regionali, pătrunzând pe calea vaselor limfatice aferente și părăsindu-i prin vasele limfatice eferente. De aici, prin canalul toracic sau marea venă limfatică, reintră în circulația sanguină.

La nivelul splinei circulația se realizează pe cale hematogenă: artera splenică — ramificații arteriolare — țesut splenic — venă splenică.

În interiorul organelor limfatice, circulația limfocitelor se efectuează prin diferitele compartimente structurale ale acestor organe. Această migrare internă se denumește „locuire" sau *„homing"* și este determinată de competența funcțională a limfocitelor și de interreacția lor cu celulele nelimfoide structurale, ale organelor limfatice (19).

Dintre organele limfatice periferice, splina este cel mai important în migrația limfocitară, cuprinzând 50% (250×10^9) din totalul limfocitelor ce circulă zilnic prin sânge, din care numai între 5 și 10% (25×10^9) se reîntorc în circulație. Limfocitele pătrund în țesutul limfatic periarteriolar trecând prin capilarele zonei marginale ce separă pulpa albă de pulpa roșie. Limfocitele T și B migrează în ariile respective prin interreacția cu celule stromale diferite: dendritice interdigitate în aria T și dendritice foliculare pentru aria B. Calea de pă-

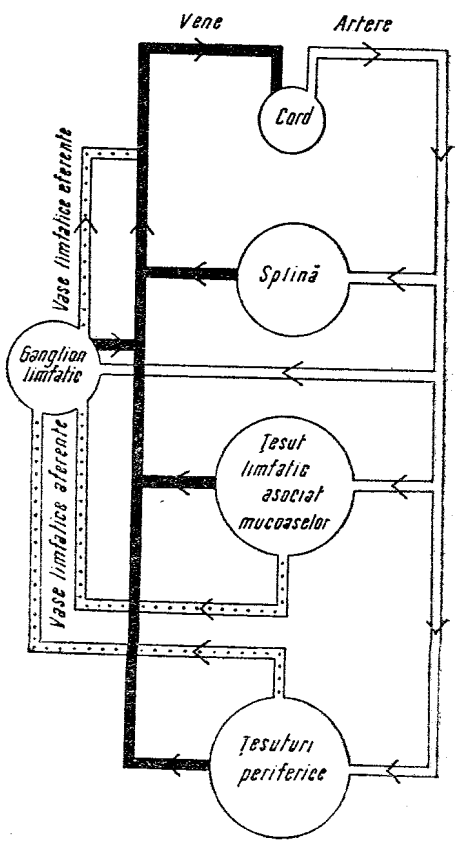


Fig. X.12. — Schema căilor de circulație a limfocitelor.

răsire a splinei este prin sinusoide între cordoanele Billroth din pulpa roşie—vena splenică. Timpul de rămânere în splină variază, fiind de 4—6 ore pentru limfocitele T şi de 24 de ore pentru limfocitele B dintre care parte nu recirculă. Mecanismul pătrunderii limfocitelor în ţesutul splenic este diferit de cel ce se realizează în alte ţesuturi limfatice şi în ganglioni. În acestea există venule capilare prevăzute cu endoteliu înalt (HEV) a căror suprafaţă este înzestrată cu diferite molecule de adeziune celulară, care condiţionează trecerea limfocitelor. Aceste procese de migraţie celulară, de traversare a pereţilor capilari, ca şi de *homing* în ţesuturile limfatice, se realizează prin stabilirea de contacte mediate de molecule de adeziune. În raport cu structura lor chimică aceste molecule sunt grupate în trei mari familii: imunoglobuline, integrine, selectine. Ele se exprimă pe suprafaţa numeroaselor tipuri celulare, funcţionând concomitent ca ligand sau receptor pentru alt ligand. Se stabilesc astfel relaţii intercelulare homeo- sau heterotipice, aderarea limfocitelor la endotelii vasculare sau la diferite componente ale matricei extracelulare. În baza acestor interrelaţii se explică mecanismele de migrare celulară, de distribuţie selectivă în diverse micromedii, ca şi realizarea răspunsului imun. Partea din moleculele de adeziune s-au identificat prin tehnicile moderne. Celulele vasculare exprimă ELAM *(endothelial leucocyte adhesion molecule)* din familia selectinelor, cu rol în circulaţia limfocitelor, monocitelor, granulocitelor; şi I-CAM *(intercellular adhesion molecule)* din familia Ig, determinantul CD54+ ce leagă LFA1 de pe suprafaţa limfocitelor (10, 2).

Pe suprafaţa limfocitelor se găsesc, de asemenea, numeroase molecule de adeziune şi receptori pentru ele. Din familia integrinelor LFA-1 *(leucocyte function antigen)* identificat prin CD11a/18+ este receptorul pentru I-CAM şi stabileşte legăturile celulă-celulă. VLA-4 CD49b/29+, legându-se de laminină, colagen, fibronectină, asigură aderarea limfocitelor pe matricea extracelulară şi pe endoteliul vascular. Atât LFA-1 cât şi VLA-4 sunt receptori ce determină recirculaţia limfocitară. Se cunoaşte şi un receptor H-CAM CD44+ cu rol în *homing*-ul limfocitar.

FUNCŢIILE LIMFOCITELOR ŞI PLASMOCITELOR

Seria limfocitară deţine rolul principal în cadrul răspunsului imun, prin funcţiile sale de reglare şi efectorii strict specifice. Funcţiile efectorii cuprind două mari aspecte: secreţia de anticorpi, realizând imunitatea umorală şi reacţiile mediate celular ce se află la baza imunităţii celulare. În realitate, aceste tipuri de răspuns imun se intrică, iar funcţiile limfocitelor trebuie înţelese ca interrelaţii complexe ce se produc în etape succesive, în cadrul cooperării celulare.

Funcţia de reglare imunologică. Reglarea celulară este efectuată de către limfocitele T prin subgrupele T *helper* (T_H) şi T supresor (T_S). Fiecare grup este programat genetic pentru a media fie funcţii reglatoare pozitive, amplificatoare, fie funcţii negative, supresoare ale răspunsului imun.

Limfocitele T_H au fenotip CD4+, sunt radiorezistente şi pot funcţiona *in vitro* fără activare prealabilă, spre deosebire de limfocitele T_S, care sunt radiosensibile şi necesită stimulare mitogenică. După stimulare,

limfocitele reglatoare sintetizează determinanți HLA-DR+ care permit cooperarea cu limfocitele B și cu macrofagele în cadrul restricției MHC.

Efectul *helper* se manifestă în urma interacțiunii cu antigenul și HLA clasa II, prin: a) inducere de proliferare a limfocitelor B și a diferențierii lor spre plasmocite cu secreție de Ig; b) expansiunea clonală cu exprimarea funcțională a limfocitelor T citotoxice, de hipersensibilitate tardivă și supresoare; c) ajută activarea macrofagelor.

Limfocitele T_S previn reacțiile imune excesive, asigură protecția față de reacțiile autoimune și, în unele situații, mențin toleranța imunologică. Acțiunea T_S se manifestă atât în imunitatea umorală împiedicând limfocitele B să sintetizeze anticorpi, cât și în imunitatea mediată celular, suprimând proliferarea și exprimarea citotoxicității limfocitelor T_C față de alloantigene.

Studii cu anticorpi monoclonali și culturile celulelor clonate cu mitogeni, indică în general o concordanță între fenotipul imun și capacitatea funcțională. Astfel, limfocitele T CD4+ corespund majoritatea, dar nu toate, cu funcții helper (tabelul 10.VI).

Limfocitele T supresoare, ca și cele citotoxice, au fenotip CD8+. Aceste grupe diferite funcțional se deosebesc prin expresiile antigenelor CD11b/ și 9.3 arătate în tabelul 10.VIII. Un sistem imun normal are raportul limfocitelor TCDu+/TDC8+=2/1—3/1. Distribuția diferitelor

TABELUL 10.VI

Limfocite T reglatoare: relația fenotip imun-funcție

Subgrup limfocite	% sânge	Fenotip imun	Funcție *in vivo*	Acțiune *in vitro*
T CD4+	45—60	CD2+ CD3+ CD5+ CD6+ CD7+ + CD45Ra=2H4+ (220 KD)	inductor supresie: T_S	ConA+
		CD2+ CD3+ CD5+ CD6+ CD7+ + CD29=4B4+ (180 KD)	— inductor help: T_H — proliferare B — maturare B — secreție Ig — maturare T_C	PHA+ PWM+ MLR prolif.
		CD2+ CD3+ CD5+ CD6+ CD7+ + CD45Ro= =UCHL+ 1(180 KD)	— memorie imună	
T CD8+	20—35	CD2+ CD3+ CD5+ CD6+ CD7+ DR+ + CD11b+, 9.3—	supresor pentru — antigen MHC II — T_H, T_C — B, secreție Ig	PHA± ConA+
		CD2+ CD3+ CD5+ CD6+ CD7+ DR+ + CD11b—, 9.3+	citotoxic pentru: antigen MHC I	MLR efector

forme ale antigenului leucocitar CD45+ pe limfocitele T CD4+ diferențiază trei subgrupe cu funcții deosebite. Acestea diferă ca greutate moleculară și ca distribuție selectivă pe limfocitele aflate în diferite etape de maturare: CD45Ra+ pe limfocitele T virgine este inductor de supresie; CD29+ pe limfocitele T mature activate este inductor de *help*; iar CD45Ro+ (UCHL-1$^+$) este prezent pe limfocitele T de memorie (11). Aceste subgrupe moleculare variază cu vârsta; astfel, limfocitele T de memorie lipsesc din sângele fetal și cresc cu vârsta copilului, iar limfocitele CD45Ra+ inductoare de supresie se reduc odată cu înaintarea în vârstă (5). Existența în sânge a 3% limfocite ce coexprimă CD45Ra+, CD29+, este o dovadă în plus că aceste forme moleculare reprezintă etape ale procesului de maturare. Acesta se produce unidirecțional, de la formele CD45 cu greutate moleculară mare, prin deleții genice, la cele cu greutate moleculară mică.

Funcțiile moleculelor CD4+ și CD8+ au fost definite prin studii de clonare și transfer genic. Proprietatea lor principală este de aderare. Liganzii fiziologici respectivi sunt moleculele codificate de genele MHC de clasa II pentru CD4+ și de clasa I pentru CD8+. În aceste interacțiuni se stabilizează și crește activitatea de legare a TCR/Cd3 față de antigen.

Cooperarea celulelor reglatorii se efectuează prin acțiuni complexe în cadrul sistemului idiotip-antiidiotip, fiind mediate prin factori umorali. Limfocitele activate secretă limfokine la nivelul contactului intercelular. Se pare că secreția se produce polarizat unidirecțional în raport cu activitatea funcțională celulară; așa, de exemplu, limfocitele CD4+ *helper* secretă factorii de proliferare și diferențiere: IL-2, IL-4, IL-5 și IL-6 în direcția stimulului. Menținerea numărului de limfocite T este asigurată printr-un mecanism homeostazic care controlează nivelul celulelor T, dar care se pare că nu distinge celule cu fenotip CD4+ de cele cu fenotip CD8+.

Secreția de anticorpi. Semnalul reprezentat de antigen declanșează etapele ce duc la diferențierea limfocitelor B, obținându-se, pe de o parte, plasmocite și, pe de alta, limfocite B de memorie imună. În răspunsul primar, limfocitele B secretă cantități mici de IgM monomeră (8S), iar plasmocitele IgM polimeră (19S). După îndepărtarea antigenului, limfocitele B de memorie rămân inactive până la un nou contact cu același antigen, fapt ce induce fenomene mutaționale genice ce se manifestă prin schimbarea izotipică a sintezei de Ig în plasmocitul diferențiat. Acesta sintetizează și secretă cantități mari de Ig de diferite clase, în cadrul aceluiași idiotip, realizând răspunsul imun secundar. Un limfocit B și, respectiv un plasmocit, produc numai anticorpi cu o singură specificitate. Capacitatea de a răspunde la o gamă largă de antigene este posibilă prin transmiterea informației genetice de la celulele precursoare la plasmocit prin cascada rearanjărilor genice din cursul ontogeniei și diferențierii limfocitelor B (32). Capacitatea unui subiect normal de a secreta cei mai variați anticorpi este nelimitată. Este bine stabilit că un asemenea subiect poate produce anticorpi specifici împotriva tuturor determinanților antigenici existenți.

Numărul mare de anticorpi ce pot fi secretați, se clasifică în cele 5 clase cu 9 izotipuri de Ig (IgM, IgD, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, IgA_2 și IgE), având proprietăți biologice diferite (tabelul 10.VII).

TABELUL 10.VII

Proprietățile principalelor clase de imunoglobuline anticorpice

Caracteristica	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
Tipul de lanț greu	γ	μ	α	ε	δ
G.M.	150 000	900 000	160 000 400 000	200 000	175 000
Coeficient de sedimentare	7S	19S	7; 11S	8S	6S
Concentrație serică adult mg/ml	12,0	1,0	2,5	0,003	0,023
Trecere transplacentară	+	—	—	—	—
Aglutinanți	+	+	—	—	—
Precipitanți	+	—	—	—	—
Fixatori de C	+	+	—	—	—
Aglutinanți în lumen intestinal	—	—	+	—	—
Activatori de mastocite	—	—	—	+	—

Anticorpii de natură IgM reprezintă prima clasă dezvoltată atât ontogenic cât și în răspunsul imun. Ei au rol predominant în răspunsul imun precoce față de majoritatea antigenilor. Ei declanșează cascada proenzimelor de complement pe calea alternă, care are ca efect fagocitarea și omorîrea multor microorganisme. Secreția lor este frânată de producerea anticorpilor de tip IgG, care domină răspunsul imun secundar. Aceștia au proprietăți citofile, prin care activează funcția macrofagică, având rol principal în imunitatea antimicrobiană. Se pot transmite de la mamă la făt, transplacentar, conferind nou-născutului rezistența la infecții.

Anticorpii IgA prezenți în ser sub formă monomerică au acțiune imunologică principală la nivelul mucoaselor digestivă, nazală și bronșică, unde sunt secretați la suprafața celulelor epiteliale sub formă dimerică secretoare. Aici au activitate antibacteriană prin aglutinarea și liza bacteriilor, precum și prin inactivarea unor virusuri. De asemenea, pot neutraliza toxine și, combinându-se cu unele molecule mari, previn absorbția lor. Nu traversează placenta, dar prin colostru conferă rezistență nounăscutului la infecții. Ei se găsesc și în salivă, în lichidul prostatic și în secrețiile vaginale, constituind același mecanism primar de apărare contra infecțiilor locale.

Anticorpii IgD reprezintă majoritatea receptorilor de recunoaștere a antigenului de pe limfocitele B. Activitatea lor efectoare este puțin cunoscută; s-a sugerat că ei ar fi implicați în diferențierea limfocitelor B.

Anticorpii IgE (reagine) asigură răspunsul de tip reaginic al hipersensibilității imediate. Cantitățile mici din ser se explică datorită proprietății lor citofilice pentru bazofile și mastocite. Legarea alergenului (alergen=antigen care stimulează producția de IgE) pe aceste celule produce degranularea celulară, cu eliberare de mediatori de tip histamină. Efectul se manifestă prin reacții inflamatorii de anafilaxie. Ei constituie și sub-

stratul umoral al atopiei. Sinteza de anticorpi poate fi studiată *in vitro*, una din modalităţi fiind testul plăcilor hemolitice Jerne. Funcţia limfocitelor B se poate aprecia şi prin răspunsul limfocitelor *in vitro* la PWM *(pokeweed mitogen)*. Acest mitogen induce activarea şi proliferarea limfocitelor B dependent de T_h şi macrofage, cu sinteză de Ig policlonale nespecifice.

Hipersensibilitatea de tip întârziat. Este reacţia imună specifică ce se manifestă la 18—24 ore de la contactul cu antigenul, prin infiltrat local de mononucleare, ca prim răspuns în bolile infecţioase, parazitare, în rejecţia homografelor şi în supravegherea inducerii tumorilor (4). Contactul cu antigenul (virusuri, fungi, micobacterii ş.a.) activează limfocite T care secretă limfokine ce iniţiază un răspuns inflamator (tabelul 10.VIII).

Producerea reacţiei depinde de calea de pătrundere şi de felul de prezentare a antigenului, în raport cu structuri codificate de MHC clasa II. Un subgrup de limfocite T, astfel stimulat, denumit T_{DH}, secretă diferite limfokine dintre care cele de tip MIF (factor de inhibiţie a migraţiei) sau LIF (factor de inhibiţie a leucocitelor), ce activează nespecific macrofagele acumulându-le la locul infecţiei. O altă limfokină, IFNγ, stimulează activitatea citolitică a acestor macrofage. Localizările reacţiilor de tip întârziat la nivelul organelor vitale ca şi exagerarea reacţiei inflamatorii, pot avea efecte nocive pentru organism.

Reacţia este întârziată deoarece este nevoie de un timp pentru sinteza limfokinelor şi manifestarea acţiunii lor.

În etapa următoare, când sunt secretate cantităţi suficiente de anticorpi, sau se manifestă reacţiile de citotoxicitate, răspunsul de hipersensibilitate tardivă este supresat printr-un grup special de limfocite T supresoare. Celulele T_{DH} de memorie imună pot refuncţiona în urma unei stimulări cu cantităţi minime de antigene şi pot transfera reacţia la alt subiect. Reacţii inflamatorii de hipersensibilitate tardivă sunt întâlnite în diverse boli infecţioase, în special tuberculoza, în dermatita sau eczema de contact şi când devin cronice pot duce la constituire de granuloame (hipersensibilitate granulomatoasă, întâlnită în tuberculoză, lepră, listerioză ş.a.).

Metodele de studiu prin intradermoreacţie, testul *in vitro* al inhibării migraţiei macrofagelor, experimentele de transfer, au contribuit la caracterizarea celulei efectoare T_{DH}, mai mult la şoarece unde celula exprimă fenotip de limfocit T_H Lyt 1+, Ia— (18).

Reacţiile citotoxice. Răspunsul celular faţă de celule străine alogene (în transplante de ţesuturi străine) sau tumorale, ca şi faţă de celule proprii modificate prin infecţii virale sau bacteriene, se efectuează prin mecanisme nespecifice şi specifice. Cele dintâi realizează prima linie de apărare a organismului în cadrul imunităţii naturale şi cuprinde ca elemente celulare: sistemul de macrofage, granulocitele şi celulele NK *(natural killer)*.

Mecanismele specifice reprezintă funcţiile efectorii ale limfocitelor T citotoxice activate specific de antigene.

TABELUL 10.VIII

Proprietățile interleukinelor

Denumire	Sinonim	Gr. mol. (kD)	Origine celulară	Localizare cromosomi	Acțiuni pe celule	
					sistemului imun	altor țesuturi
1	2	3	4	5	6	7
IL-1	MCF, LAF, SR-1	17—31	Mo, gran, fibr.	2q	— diferenț. limf. T stimulate atg.; — expresie IL—2R, secreție IL—2 și alte limfokine; — prolif. difer. limf. B, secreție anticorpi; — activarea lizei prin NK	— mobilizare, chemotactism, neutrofile, monocite — prolif. endotelii, epitelii, fibrobl., cel. sinoviale — stimularea funcției bazofile, hepatocite, cel. musculare, osteoclaste — mediază r. inflamator și r. fază acută, febră
IL-2	TCGF, TSF	15—17	limf. T	4q	— prolif. limf. T stimulate atg., mitogenic, secreție limfokine; — diferenț. timocite prolif. diferenț. limf. B activate; — activare: limf. T_C NK, LAK, monocite;	
IL-3	multi--CSF	14—28	limf. T	5q	— legătura între sistemul imun și sistemul hematopoietic	— prolif. celule stem multipotente, a progenitorilor eritro-, mielo-. megacario- mastocitelor
IL-4	BCGF-1 BSF-1	15—20	limf. T_H, mastocite	—	— maturare pre-B mici; — prolif. limf. B activate, expresie MHC, CD_{23};	— diferenț. prog. eritro, granulocite; — prolif. fibrobl. mastocite

(Continuarea tabelului 10.VIII)

1	2	3	4	5	6	7
					— schimbare izotipică și secreție de IgG_1 și IgE; — prolif. limf. T (independ. IL-2), induce limf. T_C specifice, stimul. fagocitoza	
IL-5	BCGF II, TRF	12—18	limf. T	—	— prolif. difer. limf. B activate (LPS); — sch. izotipică, secreția IgG_1, IgA; — expresia IL-2 pe limf. T	— difer. eozinofile
IL-6	BCDF, BSF2, IFN--b2	26	limf. T, mon., fibrobl.	7q	— difer. tardivă limf. B stimulate (EBV); — prolif. timocite, limf. T activate, sinergic cu IL-2; — activare limf. T_C	— stimul. progen. stem. — diferenț. megacario. — stimul. hepatocite cu r. fază acută; — prolif. plasmocitom
IL-7	Limfopoietin	25	cel. stromale	—	— prolif. pre-B mari (sIgM—) fetale; — prolif. timocite timpurii; — prolif. LAL CD7+	
IFN a și b	IFN tip I	21	mo, limf. T B, gran	9q	— expresie MHC; stimulare NK	— acț. antivirală, antiproliferativă cel., febră
IFNg	IFN tip II	15—45	limf. T, LGL	12q	— expresia MHC, IL-2R, FcIg—R;	— idem și antitumoral

(Continuarea tabelului 10.VIII)

1	2	3	4	5	6	7
					— activare T_C, T_H, NK, macrofage — inhibă acțiunea IL-4 — prolif. pre-B mici, limf. B activate	
TNF a	cachectin	17	mon, limf. T B, granul.	6p	— activare limf. T, difer. limf. B sinergic cu IL-1	— r. inflam. și procese catabolice sinergic cu IL-1
TNF b	limfotoxin	25	limf. T, B	6p	— citoliză directă a cel. tumorale; — prolif. limf. B, cu creșterea r. imun. umoral, stimulează secreția de limfokine	

Legendă: CSF=factor stimulator colonii; LAF=antigeni funcționali leucocitari; LAK=limfocite *killer* activate; LPS=lipopolisale; EBV=virus Epstein-Barr; BCGF=factor creștere celule B; BCDF=factor diferențiere celule B; IFN=interferon; UCF=factor cel. mononucleare; SR-1=reglator secreție; TCGF=factor creștere cel. T; TSF=factor stimulare T; BSF=factor stimulare B.

Prin teste funcționale *in vitro* se pot diferenția diferitele activități citotoxice, iar celulele citotoxice pot fi caracterizate prin fenotip imun (tabelul 10.IX).

Celulele NK au activitate citotoxică spontană, antivirală și antitumorală. Au rol în supravegherea imună prevenind dezvoltarea tumorilor incipiente, iar tardiv ele limitează metastazarea și elimină tumorile iradiate. Acțiunea lor este nespecifică, independentă de recunoașterea antigenului, de sistemul MHC al celulei țintă, de aceea ele nu posedă compartiment de memorie imună. Alte caractere ale celulelor NK sunt: maturația tardivă, radiorezistența, independența de timus și dependența de măduva osoasă.

Activitatea NK poate fi exprimată și de macrofage, dar efectorii principali sunt limfocitele mari granulare (LGL). Fenotipic ele fac parte din grupul „null" fără panantigene T sau B, dar au markeri asociați NK prezenți și pe alte tipuri celulare:

— CD16+ este receptorul FcRIII sau FcIgG, cu afinitate mică pentru complexele imune cu IgG. Se deosebește de forma CD16 de pe gra-

TABELUL 10.IX

Tipuri de citotoxicitate

Celule efectoare	NK	T_C	K
Fenotip	CD16+, CD56+, CD57+, CD11b/18, CD2+, CD3+, CD8+ 50%	CD3+, CD2+, CD8+, CD11a/18+, DR+	CD32+, CD11b/18
Morfologie	Limfocite mari granulare LGL	Limfocite	Celula „L" monocite granulocite
Tip celular	nonT nonB nespec.	T_C specifice	? nespecific.
Celule țintă	cel. infectate viral, alogenice tumorale	cel. alogene cel. tumorale	cel. învelite cu anticorpi
Control genetic	poligenic	restricție MHC A, B, C	poligenic
Citoliza	1) contact direct nespecific 2) exocitoza granulelor-pori	1) contact direct spec. și nespec. 2) semnal litic specific	1) fixare pe receptori FcIgG 2) fragmentul F(ab)2 produce liza
Stimulare	spontană IFN-gama, IL-2 PPD	antigen T_H	anticorpi
Inhibare	iradiere corticoizi tripsină agenți imunosupr.	T_S	ser anti-IG ser anti-F_c complexe imune
Teste	test NK	MLR	ADCC

nulocite care se leagă de IgG monomerică și nu deține porțiune transmembranică, cum are cel de pe celula NK;

— molecule de adeziune CD56+ *(neuronal cell adhesion mol)*, CD57+ și CD11b/18 (receptor pentru C_3bi);

— forma supresoare CD45Ra+;

— markeri ai limfocitului T: majoritatea exprimă CD2+ formator de rozete E, iar CD3+ și CD8+ sunt inconstant reprezentați.

Se identifică subgrupe diferite ca fenotip și ca activitate funcțională. Experimental s-a dovedit că IL-2 stimulează unele celule imature agranulare din ganglion, măduva osoasă sau timus, transformându-le în limfocite mature granulare cu acțiune citotoxică nespecifică (28). Deci diferențele fenotipice constatate pot reprezenta stadii de maturare a celulelor NK. Relația între NK și subgrupul de limfocite T ce poartă TCR gama-delta, având funcție citotoxică nespecifică, nu este bine definită. Activitatea celulelor NK este amplificată prin stimularea cu citokine: IFN gama, factor stimulator NK și IL-2. Ca urmare crește numărul lor în circulație, cresc proprietățile lor de legare, cinetica lizei celulare și secretă: IFN gama, IL-3 și B-CSF. Stimularea cu IL-2 *in vivo* și *in vitro* activează celulele NK în *„killer activate prin limfokine"* (LAK) cu eficiență funcțională crescută, atacând activ și unele celule tumorale și deci cu posibilități de aplicare în terapia antitumorală.

Mecanismul citolizei celulei țintă se produce în 2 etape:

1) legarea celulei NK de celula țintă prin molecule de adeziune;

2) liza celulei țintă în urma eliberării conținutului granulelor de enzime litice și alți componenți litici dintre care s-a izolat o proteină — perforina — cu structură analogă cu al 9-lea component al complementului. Aceasta în prezența Ca^{2+}, perforează membrana celulei țintă, formând structuri tubulare cu aspect de pori. Prin acestea pătrund în celula țintă factorii citotoxici și TNF; aceștia activează endonucleazele ce fragmentează acizii nucleici și factorii litici ce produc liza osmotică.

Celulele NK au și alte funcții: reglează răspunsul imun pe calea limfokinelor pe care le secretă, reglează hematopoieza ș.a.

Celulele T_C, citotoxice specifice, intervin tardiv în imunitatea tumorală sau alogenă și acționează specific asupra celulelor țintă ce poartă antigenele tumorale față de care au fost sensibilizate. Funcția lor se exercită cu restricția moleculelor MHC clasa I de pe suprafața celulelor țintă. În sângele subiectului normal, nestimulat, ele se găsesc sub formă inactivă. După recunoașterea antigenului, ele se diferențiază în T_C efectoare, cu fenotip de linie T: TCR/CD3+, CD2+, CD8+, DR+ și molecule de adeziune CD11a/18 (LFA-1). Se admite existența unor limfocite T_C cu fenotip CD4+ cu specificitate pentru antigenul MHC II. În elaborarea funcției citotoxice, ele cooperează cu un subgrup T_H, iar reacția este inhibată de T_S. Citoliza se produce prin contact direct cu celula țintă (3):

1) legarea este rapidă, specifică și stabilă, proces metabolic activ condiționat de Mg^{2+}. În formarea acestui conjugat au loc interacțiuni specifice între TCR/CD3+ al T_C și antigenul MHC I de pe celula țintă, care sunt stabilizate de moleculele CD8+. Intervin în mod nespecific și moleculele de adeziune. La microscopul electronic se observă interdigitațiile membranei plasmatice ale T_C cu polaritate spre celula țintă, în care se disting complexul Golgi și organizatorul microtubulilor. Nu s-a observat transfer de material nici formare de pori. Totuși nu se exclude secreție de factori litici în aria foarte limitată a contactului intercelular, ceea ce ar explica nelezarea limfocitului T_C (12);

2) semnalul litic, declanșat de interacțiunea specifică, se însoțește de creșterea nivelului Ca^{2+} în celula țintă. Se induc procese enzimatice

urmate de fragmentarea ADN, a elementelor citoscheletale și a mitocondriilor și se generează ATP ce depolarizează membrana și suprimă pompa ionică, având ca urmare liza celulei.

Limfocitele T_C se desprind apoi de celula lizată, nu se inactivează și pot lua parte la alte acțiuni litice (fig. X.13) (12).

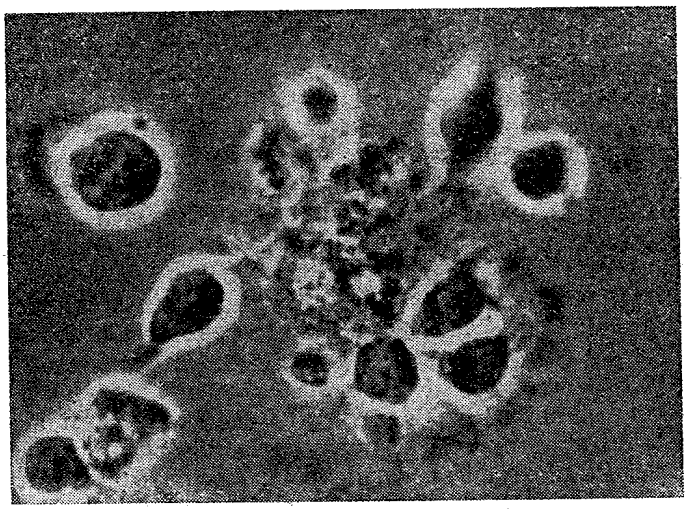


Fig. X.13. — Acțiunea citolitică a limfocitelor T_C. Cultură celule limfom și limfocite proprii stimulate (contrast de fază).

In vitro, reacția mixtă limfocitară (MLR) reproduce etapa de activare a limfocitelor citotoxice. Ele secretă, în mediul de cultură, limfotoxina, factor solubil cu acțiune citolitică nespecifică, identică cu TNFb.

Celula K nespecifică dependentă de anticorpi intervine, de asemenea, tardiv în răspunsul imun. Această celulă își exprimă citotoxicitatea prin intermediul receptorului Fc gama R I sau FcIgG de mare afinitate, identificat prin CD32+ și rozetare Ripley. Aceeași acțiune poate fi exprimată de macrofage și neutrofile, ca și de unele limfocite T_C care exprimă receptor Fc de acest tip. Horwitz (3) a identificat o celulă limfoidă ce poate lega labil molecule de IgG, de unde denumirea de celulă „L"; ea are nucleu monocitoid și a fost considerată ca efector al citotoxicității mediate prin anticorpi.

In vitro, testul ADCC *(Antibody dependent cell mediated cytotoxicity)* reproduce acest mecanism citolitic.

RĂSPUNSUL IMUN NORMAL

Protecția organismului față de agenții patogeni, ca și păstrarea integrității somatice, sub forma toleranței față de proprii antigeni, se realizează printr-o complexă cooperare între diferitele elemente celulare și umorale ale imunității naturale și ale celei adaptative.

Imunitatea naturală, înnăscută, reprezintă prima barieră de apărare rapidă și nespecifică față de agresiuni externe. Această modalitate de intervenție directă se continuă pe tot parcursul unui răspuns imun, până la eliminarea agentului patogen. Mediatorii celulari — sistemul fagocitar și celulele NK, acționează în consens cu o serie de factori serici, citokine și sistemul complement.

Imunitatea adaptativă, dobândită, acționând strict specific în recunoașterea și eliminarea antigenului, folosește modalități mai eficiente și mai economice pentru organism. Mediatorii celulari sunt limfocitele cu subgrupuri genetic determinate și mediatorii umorali, limfokinele.

Răspunsul imun este inițiat de legarea nespecifică a antigenului pe macrofag și de prezentarea lui limfocitului T sau B printr-un proces de cooperare celulară, ce conduce la recunoaștere specifică. Limfocitele reglatoare T proliferează și generează expansiunea clonală a limfocitelor efectoare: 1) T_{DH} de hipersensibilitate tardivă, ce secretă limfokine, prin care recrutează limfocite și activează macrofagele, limitând la nivel local procesul infecțios; 2) T_C citotoxice specifice distrug agentul patogen plasat intracelular sau celulele străine; 3) B secretă anticorpi, care elimină antigenul sau produsele lui toxice din circulație. Acțiunea este completată de mediatorii imunității naturale prin procesele de opsonizare, fagocitare, citotoxicitate mediată de anticorpi. Generarea concomitentă a limfocitelor T_S controlează durata și amplitudinea răspunsului imun.

În afară de stimularea antigenică, și alte tipuri de stimuli pot induce răspunsuri imune. Astfel sunt superantigenele ce cuprind majoritatea endotoxinelor microbiene, pe de o parte, și mitogenii folosiți în testele *in vitro*, pe de alta. Modul lor de interacțiune cu celulele răspunsului imun este diferit față de antigenele clasice, fiind ilustrat în tabelul 10.X.

TABELUL 10.X

Stimuli ce induc răspuns imun

Răspuns celular		Legare cu restricție MHC	Prelucrarea cu celulele prezentatoare
Antigene	Monoclonal	+	+
Superantigene	Oligoclonal	+	—
Mitogeni	Policlonal	—	—

Răspunsul imun primar. La un prim contact cu un antigen, în organism limfocitele antigeno-specifice fiind rare, acesta va fi captat de macrofage. Limfocitele T și B virgine având receptori cu afinitate redusă pentru antigen, necesită numeroase semnale stimulatoare ca și un anumit mod de prezentare a antigenului. În funcție de aria lor de localizare în organele limfatice periferice, celulele dendritice diferă ca proprietăți de interacțiune cu limfocitele virgine. Astfel celulele dendritice interdigitate din zonele T, exprimă determinanți HLA-DR+ și pot iniția un răspuns imun dependent de T, spre deosebire de celulele dendritice foliculare, fără HLA-DR, care nu iau parte la răspunsul imun primar dependent de T (19).

Limfocitele B virgine sunt recrutate în zonele T ale țesutului limfatic, unde are loc interacțiunea cu celulele interdigitate și cu limfocitele T_H. Proliferarea primelor limfocite B antigeno-specifice are loc tot în aceste zone, apoi ele migrează în folicului limfatic. În răspunsul imun primar se secretă un titru mic de anticorpi IgM cu afinitate redusă de legare a antigenului. Complexele imune timpurii dețin mici cantități de anticorpi și exprimă determinanții antigenici, fapt ce favorizează formarea limfocitelor B de memorie imună. După primul contact cu antigenul, reacția centrilor germinativi primari durează cam 3 săptămâni. În acest timp, celulele dendritice foliculare rețin complexele imune ca stimul pentru menținerea blaștilor B în ciclul celular.

Răspunsul imun secundar. În urma stimulilor induși de celulele dendritice foliculare, are loc diferențierea limfocitelor B spre celule de memorie, care trec treptat în circulație. La un nou contact cu același antigen, acesta va fi recunoscut rapid și eficient de către limfocitele T și B antigeno-specifice. Cooperarea celulară și proliferarea clonală dezvoltă foliculii secundari cu centri germinativi. În cursul proliferării limfocitelor B are loc procesul de mutație somatică ce determină sinteza diferitelor clase de Ig, în special IgG sau IgA. Răspunsul imun secundar se asociază cu cantități crescute mai ales de IgG care dețin afinitate mare de legare a antigenului.

Țesutul limfatic este sediul unde se produc interacțiunile celulare ce generează răspunsuri imune. El este constituit din organele limfatice primitive sau centrale, măduva osoasă și timusul, în care limfocitele primesc repertoriul funcțional, și organele limfatice secundare sau periferice, unde are loc exprimarea funcțională. Acestea din urmă cuprind organe delimitate printr-o capsulă, cum sunt ganglionii limfatici și splina, și țesut limfatic asociat mucoaselor din tubul digestiv, aparatul respirator, genito-urinar, canalele glandulare, distribuit în anumite zone în submucoasă sau formând structuri cu pseudocapsulă, cum sunt amigdalele.

Prin structura sa, țesutul limfatic reprezintă cel mai potrivit mediu pentru producerea răspunsului imun:

— antigenul este filtrat și captat de către macrofage;

— limfocitele recirculă prin diferitele compartimente structurale până întâlnesc antigenul specific;

— interacțiunile celulare, ca și proliferarea, se produc în centrii germinativi din care sunt eliberate în circulație celulele efectoare imediate și de memorie.

Distribuția topografică a limfocitelor B și T este diferită în anumite arii, având sisteme macrofagice diferite ca tip celular și ca structură tisulară.

Limfocitele T au tropism pentru ariile cu celule dendritice interdigitate, dispuse în rețele laxe, iar limfocitele B sunt atrase de celulele dendritice foliculare ce formează rețele dense, structurate în foliculi limfoizi În cazul unei stimulări antigenice, foliculii formează centrii germinativi unde are loc răspunsul B oligoclonal dependent de T (19).

În dezvoltarea centrului germinativ se pot urmări diferitele etape ale maturării și activării limfocitelor B, ca și raportul lor cu celulele foliculare, efectuat prin intermediul moleculelor de adeziune exprimate de acestea

din urmă. Acest contact celulele B-celule foliculare induce semnalele de diferențiere terminală (fig. X.14).

În zona întunecată a centrului germinativ proliferează imunoblaștii B și produc centroblaști. Aceștia continuă proliferarea în cursul căreia se produce mutația somatică cu comutarea izotipică a Ig. Celulele lor fiice

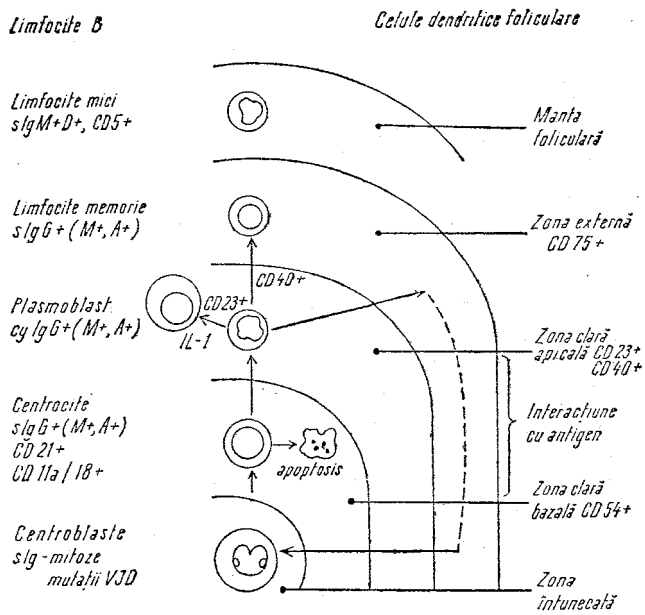


Fig. X.14. — Dezvoltarea centrului germinativ (schemă).

sunt centrocitele cu Ig de diferite clase pe suprafață; ele migrează în zona clară bazală unde întâlnesc antigenul prezentat de celulele foliculare. În funcție de semnalele primite de la celulele foliculare, centrocitele migrează spre zona clară apicală unde se diferențiază în direcții diferite:

— contactul cu CD40+ induce formarea celulelor de memorie;
— CD23+ și IL-1a produce plasmoblaști;
— IL-4 menține blaștii B în ciclul mitotic;
— CDw75 din zona externă induce un nou ciclu de proliferare.

Țesutul limfatic din ganglioni și splină este delimitat de zona marginală cu structură și celularitate deosebite; aici se găsesc limfocitele B virgine, B de memorie și efectorii răspunsului imun B independent de T.

Cooperarea celulară. Recunoașterea imună se bazează pe acțiunea trimoleculară: TCR, antigen și HLA. Receptorii de recunoaștere a limfocitelor T și B au un repertoriu vast, dobândit în cursul ontogeniei prin rearanjamente ale genelor V. Modul de recunoaștere depinde de structura receptorului. Astfel limfocitele B recunosc structurile terțiare ale moleculelor proteice în stare solubilă. Receptorul limfocitelor T necesită însă asocierea antigenului cu acele molecule HLA asemănătoare cu cele contactate în cursul ontogeniei timice.

Important este și modul de prezentare sub o formă stabilă a antigenului pe suprafața celulei prezentatoare. Aceasta se realizează în cazul proteinelor și bacteriilor, prin degradare proteolitică. Numai antigenele mici cum sunt hormonii se pot lega direct de receptorii de pe membrana celulei macrofagice.

Modul de interacțiune la nivel molecular între TCR-antigen-HLA nu este pe deplin cunoscut. Se presupune că antigenul ar reacționa în primul rând cu HLA, formând un complex ce se leagă de TCR, sau ambele se leagă separat de structuri TCR. Aceste interacțiuni sunt dependente de gradul de afinitate al TCR. Astfel limfocitele T de memorie, având TCR cu afinitate mare de legare, se pot stimula direct prin interacțiuni cu antigenul și HLA. Pentru celulele virgine intervin în plus mecanisme stabilizatoare. Acestea sunt moleculele de adeziune exprimate de limfocitele T reglatoare: CD4+, respectiv CD8+. Acestea aderă de regiunile nepolimorfice ale CMH clasa II, respectiv I, de care este legat și TCR, stabilizând aceste interacțiuni. În afară de funcția de ligand, moleculele CD4 și CD8 transduc semnale intracelulare, complementare celor emise de TCR/CD3+ (6). Se cunosc și alte molecule de adeziune, ca CD11a ce contribuie la prezentarea antigenului.

Pentru limfocitele T citotoxice specifice, condiția minimă de activare este recunoașterea antigenului prin interacțiuni cu HLA potrivit de clasa I pentru majoritatea T_C, iar o minoritate au restricție pentru HLA II. În cazul limfocitelor CD8+, este necesară formarea unei asocieri stabile a antigenului cu moleculele HLA I, care diferă după natura antigenului. În cazul antigenelor virale se asociază pe suprafață cu HLA I, alții sunt sintetizați *de novo* și coexprimați cu HLA I. În aceste cazuri un rol important revine moleculelor de adeziune CD4+, CD8+ și CD11a+.

Celulele prezentatoare de antigen variază în capacitatea de procesare și prezentare după localizarea lor.

Tipuri de răspuns imun. În răspunsurile imune inițiate la nivelul *pielii,* celulele Langerhans și mai puțin macrofagele din piele prezintă antigenul *in situ* limfocitelor T. Apoi ele migrează spre ganglionul limfatic regional, unde devin celule interdigitate continuând cooperarea cu limfocitele T și B.

Țesutul limfatic din *mucoasele digestivă și respiratorie* posedă o relativă autonomie ca tip de răspuns imun, ca subgrupe limfocitare și ca trafic celular. Antigenul din lumenul intestinal este captat de celulele M epiteliale specializate în transportul antigenului prin epiteliul intestinal și vine în contact cu limfocitele intraepiteliale din regiunea domului. Antigenul este transportat în zonele T și B ale plăcilor Peyer. Aici limfocitele B pot prezenta direct antigenul limfocitelor T și sunt activate în urma semnalelor primite de la celulele T helper. Limfocitele B activate migrează apoi spre ganglionii mezenterici, devenind imunoblaști B ce sintetizează IgA. În același timp se generează și T_S. Limfocitele T și B activate părăsesc ganglionii, trec prin splină, intră pe calea canalului toracic în sânge și revin la mucoasa intestinală sau la alte mucoase din organism unde limfocitele T intră în stratul epitelial, iar limfocitele B, ajunse în lamina propria, se diferențiază în plasmocite ce secretă IgA care constituie componentul major imunoglobulinic al secrețiilor intestinale.

IgA produsă în lamina propria ajunge în lumen traversând epiteliul mucoasei fiind legată de un component secretor. IgA protejează mucoasa inhibând proliferarea agenților patogeni.

Un tip aparte de răspuns imun umoral este reprezentat de producerea de *anticorpi polireactivi*. Aceștia sunt formați din diferite clase IgM, IgG, IgA care recunosc și pot lega mai multe tipuri de antigene, atât străine cât și proprii (1). Ei se produc în sânge în urma unor infecții bacteriene, virale, parazitare, dar constituie și un component important în bolile cu componentă autoimună. Acești anticorpi reprezintă prima linie de apărare antimicrobiană și pot activa fagocitoza și liza mediată de complement. Ei sunt secretați de un subgrup de limfocite B cu fenotip pan B, CD5+, SIgM/D+, în urma stimulării cu antigene cu structuri repetitive (EBV la om, LPS la șoarece) în mod independent de T. Acest subgrup B este majoritar în splina fetală, se reduce cu vârsta, atingând la adult numai 2% din limfocitele circulante și este slab reprezentat în splină, ganglioni și amigdale (30).

Reglarea răspunsului imun are două aspecte: pe de o parte răspunsul imun funcționează prin autoreglare, prin conexiuni celulare și umorale directe și inverse, iar pe de altă parte, toate aceste interrelații depind de comanda genetică a individului.

Antigenul este factorul declanșator al reacțiilor ce compun un răspuns imun. În funcție de masa moleculară antigenele induc răspunsuri mai intense sau mai slabe. Antigenitatea depinde de conformația antigenelor, de secvența de aminoacizi și de alți factori. Structura și conformația lor determină tipul de răspuns imun. Astfel antigenele solubile sunt recunoscute de limfocitele B, iar cele corpusculare necesită funcția T. Antigenele de natură polizaharidică, cu determinanți antigenici regulat și repetitiv exprimați, induc un răspuns B independent de T. În majoritate însă, antigenele sunt de natură proteică, cu molecule complex structurate și cu diferiți determinanți. Aceștia inițiază răspunsuri B dependente de T. Un răspuns imun poate varia și în raport cu exprimarea intermitentă a unor determinanți antigenici ascunși care se pot recicla pe suprafața celulară. Specificitatea antigenică este proporțională cu proprietatea grupării lui determinante de a se lega de anticorpii corespunzători. Unele antigene reacționează încrucișat datorită asemănării lor structurale cu alte antigene sau a unor determinanți antigenici comuni.

Unele antigene au două forme: imunogenică sau tolerogenă, inducând răspuns imun sau toleranță imună. Ca exemplu, forma agregată a IgG este imunogenă, iar forma monomeră funcționează ca tolerogenă.

Răspunsul imun este condiționat și de natura antigenului. Astfel, infecțiile bacteriene inițiază răspunsuri imune de tip umoral, iar în cele virale se exprimă reacțiile citotoxice. Doza de antigen administrată determină cantitatea și afinitatea anticorpilor. Calea de pătrundere în organism condiționează tipul de răspuns imun generalizat sau localizat la nivelul aparatului digestiv, respirator etc.

Anticorpii circulanți au rol predominant inhibitor al răspunsului imun umoral. Ei acționează prin legarea antigenului în competiție cu receptorii limfocitelor B, sau prin legarea de receptorii Fc ai acestora, fapt ce inhibă procesul de diferențiere.

Cantitativ, dozele mici de anticorpi au efect de creştere a afinităţii de legare a antigenului, având ca urmare reducerea concentraţiei acestuia, astfel că numai limfocitele B cu afinitate mare sunt eficiente.

Unele aspecte calitative ale moleculei de anticorp pot selecta anumite împerecheri preferenţiale ale antigenului cu receptorii T sau B. Clasa de anticorpi este, de asemenea, importantă. Anticorpii IgM potenţează prezentarea antigenului faţă de limfocitele T şi B, crescând producerea de anticorpi. Anticorpii de natură IgG au acţiune de supresie dacă se administrează înainte sau în timpul imunizării. Acest mecanism se poate produce prin mai multe modalităţi: mascarea antigenului, inducere de T_S, sau/şi contribuie la eliminarea complexelor imune prin opsonizare, clearing. Raportul antigen/anticorp exprimat de complexele imune influenţează răspunsul imun, activându-l sau inhibându-l prin modalităţile diferite de legare de celulele macrofagice.

Supresia pe calea reţelei idiotipice. Variaţia idiotipică a determinanţilor antigenici prezenţi pe orice moleculă de Ig, este produsă de structuri unice ale genei V; ea determină un caracter individual celulei. Aceşti determinanţi idiotipici, pe scurt idiotopi, sunt prezenţi atât pe Ig libere în ser, cât şi pe receptorii pentru antigen de pe limfocitele B şi T. Fiecărui idiotop îi corespunde în organism un tipar invers, un anticorp antiidiotip. Jerne (7) prezintă sistemul imun ca o reţea de legătură idiotip-antiidiotip, prin care comunică clonele, stimulându-se sau supresându-se reciproc. Teoria reţelei a lui Jerne se bazează pe faptul că anticorpul are nu numai capacitatea de a se combina cu antigenul, ci şi pe cea de a fi şi el antigen. Existenţa idiotipurilor, a preexistenţei anticorpilor antiidiopatici, ca şi a reţelei lor, au fost dovedite experimental pentru imunitatea umorală şi pentru cea de hipersensibilitate tardivă. În condiţii experimentale cu ser antiidiotipic se poate obţine supresia sau activarea unui răspuns imun, dovedind importanţa reglatoare a interacţiunilor idiotipice.

Pătrunderea unui antigen tulbură echilibrul reţelei printr-o secvenţă de reacţii anti-idiotip-anti-anti-idiotip, reuşind neutralizarea antigenului cu multă economie pentru sistemul imun. În acest lanţ de interreacţii se disting structurile sterice ale anticorpilor antiidiotipici, care sunt similare cu determinanţii antigenici ai antigenelor convenţionale, alcătuind „imaginea internă" a acestora. Ca urmare aceşti idiotopi, fiind recunoscuţi de anticorpii specifici, intră în competiţie de legare cu antigenul, pe care o pot bloca. Mai mult decât atât, ei pot mima funcţia antigenului reflectat, constituind un stimul pentru un răspuns imun. Sistemul imun generează niveluri foarte reduse de idiotipuri, care pot fi însă dominante în anumite răspunsuri cum sunt cele autoimune.

Limfocitele T reglatoare. Experienţele *in vitro* sugerează că reacţiile imune pot fi reglate printr-o serie de interacţiuni celulare în care intervin fie legăturile antigeno-specifice, fie interacţiuni idiotipice. Limfocitele T_H modulează răspunsul imun ajutând activarea efectorilor, atât B cât şi T (tabelul 10.VI) prin contacte directe şi prin secreţie de limfokine. S-a dovedit o dicotomie la nivel de T_H ce se distribuie în:

1) T_H1 subgrup antigeno-specific ce funcţionează cu restricţie MHC şi cu rol major în inducerea secreţiei de anticorpi specifici;

2) T_H2 subgrup idiotip-specific funcţionează fără legătură cu MHC

și amplifică clonele B ce poartă idiotipul dominant pentru a secreta anticorpi antiidiotipici.

Existența supresiei mediate celular a fost pusă la îndoială, însă diferite sisteme experimentale dovedesc existența celulelor T_S în răspunsurile lor imune: antihaptenă, isotip și allotip specifice cu restricție MHC. Au fost identificate și limfocite T_S idiotip-specifice, care acționează pe două căi în funcție de imunogen:

1) serul antiidiotipic generează T_S1 ce suprimă acțiunile limfocitelor T_H2 idiotip-specifice;

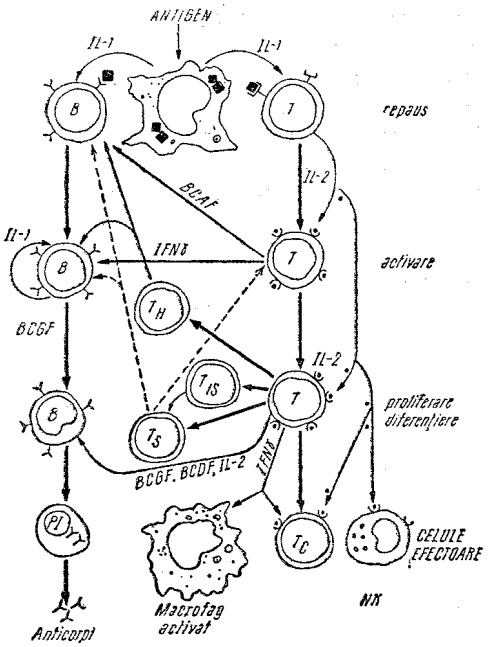


Fig. X.15. — Schema cooperării leucocitare în cadrul răspunsului imun. BCAF: factor de activare a limfocitelor; BCGF: factor de proliferare a limfocitelor B; BCDF: factor de diferențiere a limfocitelor B; IFN: interferon; IL-1 sau IL-2: interleukine 1 sau 2.

2) idiotipul induce limfocite T_S2 purtând antiidiotip, care vor reacționa cu limfocitele B ce exprimă idiotipii corespunzători, inducând supresia specifică de idiotip.

Aceste subgrupe limfocitare, în anumite condiții se activează secvențial în cursul unui răspuns imun: T_H1 T_H2/T_S1 T_S2.

Reglarea genetică a răspunsului imun. Omul ca și animalele prezintă variații individuale ale răspunsului față de un antigen. Este cunoscut faptul că unele boli se întâlnesc mai frecvent în anumite familii, ceea ce indică implicarea unor mecanisme moștenite. Capacitatea unui organism de a reacționa printr-un răspuns imun, eficient sau mai redus, se află sub control genetic, fapt confirmat prin experimente pe linii pure de cobai și de șoareci. În baza datelor obținute până în prezent, răspunsul imun este dirijat de două regiuni genetice:

1) genele V (regiuni variabile ale Ig), plasate la om pe cromosomul 14 pentru lanț greu, pe cromosomul 2 pentru lanț ușor kappa și pe cromosomul 22 pentru lanț ușor lambda. Fiind asamblate cu genele C într-un complex genetic activ, ele codifică sintezele moleculelor de anticorpi secretate și a receptorilor de recunoaștere de pe limfocitele B și T;

2) genele de „răspuns imun" Ir sunt incluse la șoarece în regiunea I a complexului major de histocompatibilitate H-2, iar produșii genetici sunt antigenele Ia. La om genele complexului major de histocompatibilitate sunt localizate pe cromosomul 6. Acesta este format din mai multe regiuni genetice ce codifică: antigenele majore de transplantare sau de clasa I, prezente pe toate celulele organismului (excluzând neuronii și spermatozoizii) și antigenele minore de transplantare clasa II, prezente numai pe membrana celulelor răspunsului imun.

Alăturarea acestor gene ale căror produse au acțiuni sinergice, sugerează că ele provin dintr-o singură genă ancestrală, reduplicată în cursul filogeniei, care a asigurat speciei posibilitatea de a deosebi propriul de străin. Genele de răspuns imun se moștenesc după model simplu mendeleian, ca trăsături dominante. Harta acestor gene s-a stabilit la șoareci prin studierea liniilor pure de animale imunizate cu antigene sintetice, ca și prin recombinarea acelor linii de animale ce diferă numai printr-un loc genetic. Concluziile obținute la animale se pot interpreta prin analogie la om. Regiunea genetică D este subîmpărțită în DP, DQ, DR și codifică antigenii HLA-DR ce reprezintă MHC de clasa II. Aceste antigene sunt localizate pe membrana celulelor prezentatoare de antigen, pe limfocitele B și pe limfocitele T activate. Ele reglează interacțiunile celulare în toate etapele răspunsului imun, condiționându-le de restricția MHC.

În prezent se cunosc și gene nelegate de MHC care pot regla anumite răspunsuri imune antiinfecțioase. Astfel rezistența la *Mycobacterii, Leishmania donovani* și *Salmonella typhy murium* este legată de o genă localizată pe cromosomul 1. Acțiunea ei se manifestă prin inhibarea replicării agenților infecțioși plasați intracelular. Aceste gene influențează evoluția infecției în primele zile, după care intervine răspunsul imun mediat de limfocitele T. Analiza genetică a liniilor de animale sensibile sau rezistente la infecții virotice arată importanța ambelor seturi de gene Ir, legate și nelegate de MHC.

Reglarea umorală a răspunsului imun se produce prin factorii nespecifici secretați de macrofage și de limfocitele T. Interleukinele sunt factori solubili de natură proteică, similare hormonilor, ce asigură comunicarea intercelulară în cadrul sistemului imun. Sunt produse în principal de limfocite sub stimul antigenic sau mitogenic *(in vitro)*. O interleukină poate fi secretată de mai multe tipuri celulare, pe cale paracrină sau apocrină. Efectele lor biologice se manifestă pe diferite tipuri celulare, depinzând de prezența, numărul și afinitatea receptorilor complementari, ca și de prezența unor liganzi.

Tehnologia clonării genice a condus la purificarea interleukinelor și la studierea efectelor lor. Rolul lor principal este cel de moleculă mesager în cadrul cooperării interleucocitare, transmițând semnalele de activare, proliferare și diferențiere celulară în diferitele etape ale răspunsului imun. Ele activează funcția citolitică a celulelor efectoare citotoxice. Prin acțiuni complexe asupra celulelor din diferite țesuturi ele contribuie la producerea reacției de inflamație locală și ale proceselor metabolice caracteristice răspunsului de fază acută.

Numeroase leukine intervin ca factori stimulatori ai celulelor hematopoietice, pentru diverse linii celulare incluzând și pe cea limfocitară (tabelul 10.VIII). Ele asigură în acest fel legătura între sistemul hematopoietic și cel imun. Pe lângă acestea, McKenzie și colab. au descris recent interleukina 13 (IL-13), limfokină imunoreglatoare produsă de limfocitele T și care are mai multe acțiuni: modificări ale monocitelor cu formare crescută de molecule clasa II a CMH și cu o afinitate scăzută a receptorului pentru IgE; stimularea proliferării limfocitelor B; inducerea de niveluri considerabile de IgM și IgG, dar nu și de IgA (21a).

Prostaglandinele, în special cele din seria E, participă și ele la reglarea răspunsului imun, exercitând în general un efect imunodepresor al funcțiilor limfocitelor B și T. Ele acționează atât asupra limfocitelor B stimulând secreția de IgE și IgGl, cât și asupra producției de citokine de către limfocitele T, în mai multe moduri:

— inhibă producția de IL-2 și de receptori pentru IL-2 de către limfocitele T;

— afectează echilibrul IL-2—IL-4 prin creșterea producției de către limfocitele T_H2 de IL-4 și IL-5;

— scad producția de interferon γ de către limfocitele T_H1;

— cresc expresia de IL-1 pe mononuclearele sanguine periferice.

Prostaglandinele stimulează mult sinteza GM-SCF care are ca rezultat producția crescută de macrofage de către măduva osoasă și inducția expresiei de molecule de clasa II SMH pe unele macrofage, crescându-le astfel proprietatea de a prezenta antigenul celulelor imunocompetente.

În reglarea răspunsului imun intervin și factori endocrini și psihonervoși. Pe celulele imunocompetente au fost identificați receptori specifici pentru numeroși factori endocrini, cum sunt: ACTH, hormonul de creștere, prolactina, hormonii steroizi, VIP, substanța P, catecolamine, acetilcolină, factori liberatori de hormoni, opioizi. Interacțiunile între factorii endocrini și receptorii lor situați pe celulele imunocompetente, pot modifica activitatea acestora prin activarea mesagerilor secundari de tip cAMP și cGMP.

Factorii neuroendocrini pot modula răspunsul imun și indirect prin afectarea producției de monolimfokine. Limfocitele activate sintetizează și secretă mici cantități de diferiți hormoni: ACTH, hormoni de creștere, prolactină, hormon stimulator tiroidian, somatostatina, VIP și mai multe endorfine.

Pe de altă parte, date recente au adus dovada existenței unor corelații între sistemul nervos și sistemul imun. Astfel, experimental, lezarea hipotalamusului produce modificări ale numărului celulelor din organele limfatice și modularea funcțiilor imune. Lezarea hipotalamusului anterior și a corpilor mamilari produce o reducere a proliferării limfocitare stimulată prin antigeni sau mitogeni, pe când lezarea numai a corpilor mamilari, a hipocampului și a complexului amigdalian au ca efect o stimulare intensă a răspunsului proliferativ limfocitar. Hipofizectomia suprimă atât efectele inhibitoare cât și cele stimulatoare ale leziunilor nervoase menționate, fapt ce arată că în modulările imune observate sunt implicați hormonii neuroendocrini.

Alte observații au demonstrat că și sistemul nervos vegetativ are efecte imunomodulatoare. Recent au fost identificate fibre noradrenergice în timus, ganglionii limfatici și în splină; în aceasta din urmă fibrile nervoase adrenergice vin în contact direct cu limfocite T și B, cu macrofage și cu celule IgM pozitive, ceea ce denotă existența unor interacțiuni directe și pune în evidență o cale directă prin care sistemul nervos vegetativ influențează celulele efectoare specifice ale sistemului imun. Alte observații au arătat că și sistemul colinergic este implicat în modularea funcțiilor imune.

Rezultă că sistemul nervos poate exercita o influență reglatoare asupra sistemului imun și că acesta, la rândul lui, poate influența sistemul nervos.

Influențele celor două sisteme unul asupra altuia implică existența a două linii bidirecționale de comunicare între cele două sisteme. Comunicarea de la sistemul nervos la sistemul imun se face pe calea inervației țesuturilor limfatice, a neurohormonilor, a hormonilor endocrini și a unor peptide cum sunt enkefalinele și endorfinele, iar comunicarea între sistemul imun și sistemul nervos este realizată prin produsele celulelor imune efectoare, cum sunt limfokinele și monokinele (17a).

MODIFICĂRI NUMERICE ȘI STRUCTURALE ALE LIMFOCITELOR ȘI PLASMOCITELOR

Variațiile fiziologice ale numărului de limfocite sunt în raport cu vârsta: la sugar 50% (6 500/mm^3), la copil 35—45% (2 800/mm^3), la adult 22—34% (1 500—2 000/mm^3), iar la bătrâni sub 20%. Se cunosc și modificări cantitative familiale (13, 16).

Limfocitoze reactive accentuate se întâlnesc în infecții virale ca: tusea convulsivă, limfocitoza infecțioasă acută și în mononucleoza infecțioasă, în care limfocitoza este asociată cu plasmocite și monocite. Limfocitoze reactive moderate se observă și în alte boli infecțioase acute (rujeolă, rubeolă, varicelă, parotidită epidemică, hepatite, infecții cu Coxsackie, citomegalovirus, tifoidă) sau cronice (tuberculoză, lues, toxoplasmoză, bruceloză), ca și în unele tulburări de metabolism (rahitism, hipertiroidie). Modificările primare neoplazice ale seriei limfatice, cum sunt leucemiile și limfoamele nonhodgkiniene și hodgkiniene prezintă — alături de modificări numerice — și atipii celulare. Cifrele maxime ale limfocitozei sunt întâlnite aproape constant în leucemia limfatică cronică.

Limfocitopeniile (sub 1 500/ml) pot avea 3 mecanisme de producere:

1) producție scăzută, care poate fi: a) dobândită, provocată de diverse cauze: malnutriție, radiații, agenți imunosupresori (citostatice, glucosteroizi), boala Hodgkin, boli endocrine (mixedem, boala Cushing) și b) congenitale, cu două forme: imunodeficiență limfopenică cu deficit selectiv de limfocite B, T sau mixt și imunodeficiență severă combinată, cu lipsă totală de limfocite și granulocite, observată rareori la gemeni identici, cu transmisie probabil autosomală, incompatibilă cu viața, dar

care într-un caz a fost normalizată după un transplant de măduvă osoasă autologă;

2) modificări în circulația limfocitelor, tranzitorii (24—48 de ore), întâlnite în situații de stres (infecții, traumatisme), mediate probabil de creșterea glucosteroizilor endogeni care scade rapid numărul limfocitelor B și T din circulație;

3) distrucții crescute sau pierderi. Distrucții de limfocite se pot datora fie unui mecanism imun mediat de anticorpi antilimfocitari (în boli autoimune), fie unor infecții virale: rujeolă, varicelă, zoster, poliomielită și în special SIDA. În infecția cu HIV limfocitopenia se datorește infectării selective a subpopulației de limfocite helper CD4+. În ultimii ani au fost semnalate cazuri de imunodeficiență cu limfocitopenie selectivă TCD4+, ca în SIDA, dar idiopatică, fără nici o dovadă de infecție cu HIV (16a).

Pierderi de limfocite se produc în rupturi sau fistule ale canalului toracic sau din limfacitele intestinale în enteropatiile cu pierderi de proteine, insuficiențele cardiace grave.

Creșterea numărului de plasmocite în sângele circulant peste valoarea normală (1—2%) este rară. Se întâlnesc *plasmocitoze* reactive în unele boli infecțioase, ca rubeola, varicela, mononucleoza infecțioasă și în cirozele hepatice, în alergia la penicilină și în boala serului. O entitate rară este leucemia cu plasmocite, în care se întâlnesc forme imature și atipice de plasmocite. O creștere a numărului de plasmocite este, de obicei, expresia unei sinteze mărite de imunoglobuline.

Modificările structurale ale limfocitelor și plasmocitelor se întâlnesc în bolile reactive, dar în mod constant se observă în bolile neoplazice limfoplasmocitare.

Formele Rieder reprezintă limfocite cu incizuri nucleare unice sau multiple. Se pot observa în tusea convulsivă, leucemia limfatică cronică și, uneori, după splenectomie. În leucemiile limfatice cronice se pot întâlni forme celulare dezgolite de citoplasmă sau limfocite cu granulații azurofile exagerate; caracteristice acestei boli sunt umbrele nucleare Gumprecht ce dovedesc fragilitatea celulară.

Celulele limfoplasmocitare, cu nucleu rotund cu cromatina dispusă radial și citoplasmă abundentă bazofilă, sunt prezente în mononucleoza infecțioasă. Tot în cadrul infecțiilor virotice se întâlnesc limfocite activate sub formă de celule hiperbazofile și celule de iritație Türck.

Celulele Mott reprezintă plasmocite cu vacuolizare exagerată sau cu aglomerări de corpi Russell ce pot comprima nucleul. După liza celulei, conținutul proteinic eliberat se condensează sub forma corpilor Russell. Sunt observate în boli infecțioase acute și în plasmocitom. În acesta din urmă, plasmocitele pot avea incluzii cristaline aciculare sau sub formă de pete azurofile. Accentuarea componentei metacromatice roșietice la periferia citoplasmei plasmocitelor produce aspectul de „flacără" întâlnit atât în stări reactive, dar mai ales maligne.

Poliploidia (celule cu un număr de cromosomi multiplu de 2n) sub forma nucleilor giganți sau a celulelor bi- sau multinucleate, poate fi întâlnită în seria limfoidă în bolile infecțioase, dar mai ales în leucemii și limfoame. La plasmocite, poliploidia este un aspect normal în țesuturi

și apare frecvent în plasmocitom unde pot fi observate și plasmocite cu nuclei segmentați.

Prezența celulelor imature limfoide sau plasmocitare în sângele periferic reprezintă modificări primare din limfoproliferările maligne cu descărcare periferică; ele sunt clone maligne oprite la un anumit stadiu de maturare, asociate cu atipii celulare, ce pot fi, mai mult sau mai puțin, accentuate. În unele cazuri, structura nucleului poate indica originea subgrupului limfoid proliferat: nuclei contorsionați (aspect de „rufă stoarsă") sunt mai frecvenți în neoplaziile limfoide T, iar nucleii riederiformi în proliferări maligne ale limfocitelor B. Precizarea tipului celular malign din aceste cazuri se face prin imunfenotipare ce completează morfologia clasică.

BIBLIOGRAFIE

1. ANTIN J. A. și colab: J. Immunol. 1986; 136: 505.
2. BARKER H. F.: LEYEA 1992; 8: 189.
2a. BECK W. S.: Hematology. MIT Press, Cambridge, Massachussetts, 1991.
3. BERKE G.: Immunol. Let. 1989; 20: 169.
4. BERCEANU Ș., PĂUNESCU E.: Biologia și patologia imunității. Edit. Academiei, București, 1981.
5. BEVERLEY P. C.: Immunol. Let. 1987; 14: 263.
6. BIERER B. E. și colab.: Ann. Rev. Immunol. 1989; 7: 579.
7. BONA C. A., PERNIS B.: În Paul W. E. (ed.): Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1984, 577.
8. BURNETT F. M., HOLMES M.: The Thymus, Ciba Found. Simp. Edit. Churchill, Londra, 1966, 381.
9. BUTCHER E. C. și colab.: Clinic. Conf. Cancer 1984; 191.
10. CHEN C. S., HAWIGER J.: Blood 1991; 77: 2200.
11. CEROTTINI J. C., ROBSON McDONALD H.: Ann. Rev. Immunol. 1989; 7: 487.
12. FLEISCHER B., SCHREZENMEIER H., WAGNER H.: J. Immunol. 1986; 136: 1625.
13. FREEDMAN A. S., NADLER L. M.: Semin. Oncol. 1987; 14: 193.
14. FREEDMAN A. S., NADLER L. M.: Clin. N. Amer. 1991; 5: 871.
15. HAZELWOOD M., KUMARARATNE D. S.: Clin. Exp. Immunol. 1992; 89: 327.
16. HEILMEYER L.: Handbuch für Inneren Medizin. Blutkrankheiten, Springer, Berlin, 1942, 337.
16a. HO D. D. și colab.: N. Engl. J. Med. 1993; 328: 380.
17. JANSEN J. H., FIBBE W. E., EILLEMZE R., KLUIN-NELEMANS J. C.: Blut 1990; 60: 269.
17a. KHAUSARI D. și colab.: Immunol. Today; 5: 170.
18. KINCADE P. W.: Ann. Rev. Immunol. 1989; 7: 111.
18a. KLEIN J.: Immunology; Blackwell Sc. Publ., 1991.
19. LIU Y. J. și colab.: Immunol. Today 1992; 13: 17.
20. MAJDIC O., BETTELHEIM P., LISZKA K., LUTZ D.: Wien. Kl. Wschr. 1982; 94: 387.
21. MARUSIC-GALESIC S., PAVELIC K.: Immunol. Let. 1990; 24: 149.
21a. McKENZIE J. L. și colab.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1993; 90: 3735.
22. MOSSALAY M. D. și colab.: Exp. Hematol. 1990; 18: 326.
23. MUELLER D. L., JENKINS M. K., SCHWARTZ R. H.: Ann. Rev. Immunol. 1989; 7: 445.

24. PILARSKI M., DEANS J. P.: Immunol. Let. 1989; 21: 187.
25. RĂILEANU C., RĂILEANU-MOȚOIU IOANA: Atlas de Hematologie Clinică, Edit. Academiei, București, 1974.
26. RAULET D. H.: Ann. Rev. Immunol. 1989: 7: 175.
27. REINHERTZ E. L: Immunol. Today 1985; 6: 75.
28. RICHARDS S. J., Scott C. S.: Leukemia Lymphom. 1992; 7: 377.
29. TEATLE R.: Exp. Hematol. 1990; 18: 360.
30. UCKUN F. M.: Blood 1990; 76: 1908.
31. UCKUN F. M. și colab.: Leukemia Lymphom. 1992; 6: 117.
32. WESTERMANN J., PABST R.: Immunol. Today 1990; 11: 406.

XI

PLASMA SANGUINĂ

C. POPPA, FLORICA ENACHE

Deşi organismele superioare îşi duc existenţa într-un mediu extern, celulele lor trăiesc în realitate într-un mediu propriu, care le nutreşte şi în care îşi elimină produsele de catabolism. Acest lichid este mediul intern, nume sub care Claude Bernard a înţeles ansamblul lichidelor extracelulare. Sângele şi lichidul interstiţial fac între ele schimburi continue, de aceea compoziţia lor este foarte asemănătoare. Se poate deci considera sângele ca sectorul mediului intern, care circulă rapid în patul vascular şi ale cărui proprietăţi fizice şi constituţie chimică sunt constante. Variaţiile sale sunt rapid corectate graţie unui complex de mecanisme, deoarece funcţiile organismului sunt astfel reglate încât să menţină un echilibru stabil în mediul interior, ceea ce Claude Bernard a numit „fixitatea mediului intern", Cannon „homeostazie", iar Heilmeyer „izostructură". Acest echilibru este o condiţie indispensabilă pentru desfăşurarea funcţiilor organismului animal.

ROLUL PLASMEI ÎN ORGANISM

Sângele este un ţesut lichid. El se compune din elemente figurate în suspensie într-un mediu lichid amorf denumit plasmă, totul fiind conţinut în aparatul circulator şi în continuă mişcare. Dintre aceste două mari constituente, plasma (vehiculul elementelor figurate) este cel puţin tot atât de importantă ca şi celulele, deşi acest fapt nu apare la prima vedere. Prin plasmă se înţelege partea lichidă a sângelui, obţinută în anumite condiţii; sângele recoltat pe un anticoagulant, după o perioadă de câteva ore se separă în două porţiuni distincte: una inferioară, formată din elemente figurate, şi un lichid supernatant, clar şi gălbui, denumit plasmă. Sângele recoltat fără anticoagulant după câteva ore se separă şi el în două porţiuni: una inferioară, cheagul, constituit

din fibrină și elementele figurate ale sângelui, și una superioară, limpede și gălbuie, denumită ser. Atât plasma, cât și serul, reprezintă, deci, fiecare, partea lichidă a sângelui, însă una înainte, cealaltă după coagularea sa. Plasma conține, în plus față de ser, factorii coagulării și fibrinogenul, pe care serul nu-i posedă, deoarece s-au consumat în timpul procesului de coagulare. În afara acestor deosebiri, cele două lichide sunt identice.

Plasma conține micelii, molecule și ioni. Datorită circulării sale, plasma îndeplinește în organism următoarele funcții:

— *nutritivă:* duce țesuturilor substanțe nutritive resorbite din intestin sau produse de organism, pentru a fi utilizate sau depozitate;

— *excretoare:* vehiculează reziduurile metabolismului celular la emonctorii, spre a fi eliminate;

— *imunologică:* transportă anticorpii, complementul și substanțele alexice în tot organismul;

— *umorală:* transportă hormonii și vitaminele la toate organele pentru reglarea funcțiilor lor;

— *de echilibrare electrolitică:* ionii resorbiți din alimente sau produși în organism circulă continuu între cele două compartimente lichide ale mediului intern, plasma și lichidul interstițial;

— *de echilibrare fluidocoagulantă:* datorită conținutului său în factori procoagulanți și anticoagulanți, ea menține echilibrul hemostazei; datorită conținutului în factori profibrinolitici și inhibitori antifibrinolitici menține echilibrul fibrinolizei; în plus, menține în permanență în echilibru dinamic cele două funcții de mai sus, asigurând astfel homeostazia hemostazei sau echilibrul fluidocoagulant ai sângelui;

— *de reglator termic:* prin conținutul său ridicat în apă (corp cu mare căldură specifică), plasma înmagazinează o mare cantitate de căldură la nivelul organelor producătoare de energie exotermică; prin circulația sa rapidă, ea distribuie rațional căldură tuturor organelor și o pierde, mai mult sau mai puțin, în marele radiator organic, care este pielea;

— *de reglator hidroosmotic:* grație cantității sale mari de proteine, ea își menține constantă presiunea și face astfel posibil schimbul permanent al apei între patul vascular și spațiile interstițiale (legea Starling);

— *de reglator al pH-ului:* datorită multiplelor sale sisteme tampon, ea menține constant echilibrul acidobazic al sângelui și, consecutiv, al întregului mediu intern;

— *de reglator al tensiunii arteriale:* prin masa ei ea umple patul vascular, menținând tonusul mecanismelor, care asigură constanța tensiunii arteriale.

Prin toate aceste funcții, plasma menține fixă compoziția mediului intern și a principalelor sale constante fizicochimice, împotriva fluctuațiilor neîncetate datorite vieții țesuturilor, grație unui echilibru dinamic complex; ea intervine în reglarea funcțiilor, stabilește interrelații dintre organe și este un mijloc important al asigurării unității funcționale a organismului. Ea servește totodată și ca transportor pentru numeroase elemente și substanțe ca fier, cupru, medicamente ș.a.

Principalele grupe de proteine plasmatice implicate în reacțiile ce contribuie la apărarea organismului față de agresiunile tisulare ar putea constitui, după unii autori, un așa-numit „sistem de contact" al plasmei. Activarea prin suprafețe încărcate negativ (membrana bazală a vaselor, cartilajul articular, condroitinsulfatul etc.) a factorului Hageman, piesa centrală a acestui sistem, declanșează mai multe cascade de reacții enzimatice ce duc la coagularea sângelui, la fibrinoliză, la formarea de kinine și la stimularea complementului.

CARACTERELE FIZICE ALE PLASMEI

Plasma se prezintă ca un lichid clar, de aspect fluid, de culoare ușor gălbuie, fără miros și cu gust ușor salin. Proprietățile sale fizice sunt următoarele:

Culoarea ușor gălbuie este datorită bilirubinei, pigmentul normal prezent în plasmă în anumite proporții. În ictere, culoarea sa galbenă se intensifică. Ori de câte ori culoarea este ușor rozată înseamnă că a avut loc o hemoliză, iar aspectul ei lăptos exprimă o hiperlipemie.

Densitatea plasmei sau greutatea sa specifică este de 1,0265, spre deosebire de cea a globulelor, care este 1,097 și de cea a sângelui integral care este 1,060 (1,0595). Densitatea plasmei depinde esențial de concentrația sa în proteine, ceea ce a permis lui Van Skyle să imagineze o metodă rapidă de determinare a proteinelor plasmatice totale pe baza măsurării densității plasmei. Greutatea specifică a plasmei poate fi determinată cu ușurință și prin metoda Hamilton, făcând să cadă câte o picătură de plasmă în soluții de densități cunoscute și oprindu-ne acolo unde picătura rămâne între două ape, indicând pentru soluția cunoscută și plasma de testat o aceeași greutate specifică.

Viscozitatea relativă (in vitro) a plasmei este de 1,65—1,85 c.p. față de cea a sângelui total, care este mult mai mare (4,0—4,5 c.p.) din cauza prezenței eritrocitelor. Viscozitatea plasmei ține exclusiv de cantitatea de proteine conținute și mai ales de fracțiunea globulinică. Viscozitatea serului este cu 7% mai mică decât a plasmei, datorită lipsei fibrinogenului (1,55 1,75 c.p.). Viscozitatea relativă se determină cu viscozimetrul Hess*.

Căldura specifică a plasmei este de 0,94 cal, pentru 1 g plasmă liofilizată.

Presiunea osmotică a plasmei este aceeași cu cea a sângelui total (5,852 mmHg la 37°C) și corespunde unui punct crioscopic de $\Delta = 0{,}56°C$. Ea este datorită electroliților din plasmă și în special (75—80%) clorurii de sodiu (osmolaritate de 301 m·osm).

Conductibilitatea electrică a plasmei este de 70 ohmi la 37°C, corespunzând unei concentrații ionice normale de 304 mEq/l.

---

* Unitatea de viscozitate este poise = $cm^{-1} \cdot g \cdot s^{-1}$ folosită în industrie.

c.p. = centi poise = unitatea biologică de măsurare a viscozității relative. Referentul standard este apa distilată care are 1 c.p.

Față de 1 poise, care este unitatea fizică de bază a viscozității (de la numele lui Poiseuille), unitatea biologică este de 100 de ori mai mică.

Tensiunea superficială (σ) variază cu temperatura: 57 dyne/cm^{-1} la 18°C, iar la 37°C 47 dyne/cm^{-1} (Loiseleur).

Indicele refractometric este de 1,35, în funcție de concentrația proteinelor plasmatice. Există o metodă rapidă, pentru clinică, de dozare a proteinelor totale cu refractometrul, pe baza relațiilor dintre concentrația proteinelor plasmatice și indicele refractometric al plasmei sau serului respectiv (Wunderly—Wuhrmann).

pH-ul plasmei este 7,35 (7,34—7,36), iar *rezerva alcalină* este de 63 volume CO_2%.

Volumul plasmei în organism. Nu se poate vorbi de volumul plasmei izolat de al sângelui total, fiindcă aceste două elemente se găsesc fiziologic complet intricate. Raportul globule/plasmă este în medie 46/54 la bărbat și 41/59 la femeie. Acest raport se obține folosind tehnica de „determinare a hematocritului" și este datorată lui Hedin. Această metodă simplă, rapidă și precisă permite să se determine concentrația globulelor în plasmă cu mai puține erori decât numărătoarea eritrocitelor. Ea are în clinică o importanță de prim ordin, deoarece furnizează rapid date precise asupra echilibrului dintre masa globulară și cea plasmatică, ajutând considerabil în diagnosticarea sindroamelor de hidratare, deshidratare, șoc, hemoragie, colaps etc.

În ceea ce privește însă valorile volumetrice absolute ale sângelui, plasmei și globulelor, acestea se obțin prin metode mai complicate. Ele se pot grupa în metode directe și indirecte. Primele au doar o valoare istorică, deoarece au fost depășite în timp. Metodele indirecte se adresează fie globulelor, fie plasmei, întregind apoi volumul total sanguin pe baza calculului hematocritului. Dintre metodele care se adresează globulelor se folosește cea cu eritrocitele marcate, iar dintre cele ce se adresează plasmei: cu coloranți (Evans blue T 1824), cu polivinilpirolidon, cu albumină marcată (RISA)* etc.

Rezultatele obținute cu oricare din metodele indirecte menționate sunt, în general, foarte apropiate, dând următoarele cifre:

Sânge

♂=5,5 l; 78 ml/kg corp; 8% din greutate (70 kg)
♀=4,2 l; 70 ml/kg corp; 7% din greutate (60 kg)

Plasmă

♂=3,0 l; 44 ml/kg corp; 4,3% din greutate (70 kg)
♀=2,5 l; 41 ml/kg corp; 4,1% din greutate (60 kg).

Variațiile de volum pot îmbrăca aspecte diferite, după cum privesc volumul total de sânge, volumul globular sau cel plasmatic. În toate cazurile, aceste variații nu pot merge decât în două sensuri: creștere sau diminuare față de normal. Schema lui Rowntree (fig. XI.1) grupează în trei categorii și nouă tipuri întreaga gamă a variațiilor volumului sanguin total și al componentelor sale.

Factorii de variație pot fi fiziologici și patologici. În ceea ce privește factorii fiziologici, volumul sanguin crește proporțional cu greutatea cor-

* RISA = *R*adio *I*odine *S*erum *A*lbumina.

pului, dar nu după o funcție liniară, ci având ca factor exponențial al greutății cifra 0,72 (Dreyer). Aceasta explică de ce copiii și animalele au sânge mai mult pe kg corp, comparativ cu oamenii adulți. Sexul influențează și el volumul sanguin, în sensul că bărbatul are mai mult sânge decât femeia, dar numai după pubertate (și dacă femeia nu este însărci-

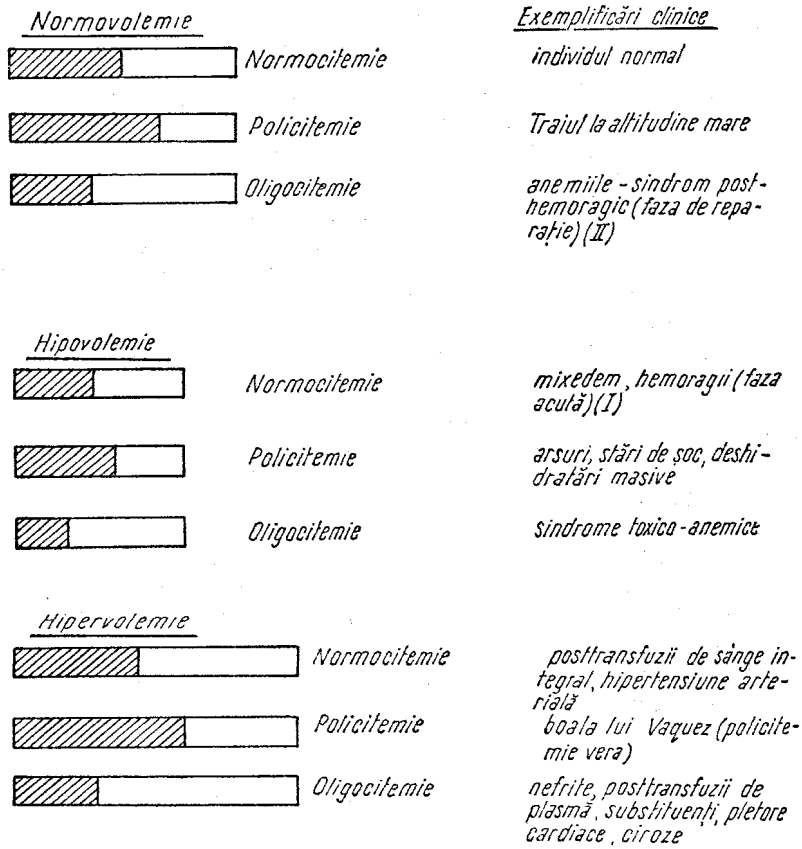


Fig. XI.1. — Masa sanguină, volumul eritrocitar și volumul plasmatic în diferite afecțiuni (după Brown și Rowntree).

nată). Factorii termici externi (căldura, frigul) influențează volumul sângelui circulant, mărindu-l, respectiv micșorându-l, deoarece modifică schimburile apoase ale acestuia cu lichidul interstițial. Trecerea de la clinostatism la ortostatism micșorează volumul sângelui, în timp ce exercițiul muscular îl mărește.

În clinică, cunoașterea volumului sanguin este importantă deoarece diminuarea volumului sanguin determină o insuficiență de irigare a organelor și, astfel, o insuficiență de oxigenare, care duce la hipoxie. Rezultă o creștere a permeabilității capilare, cu transvazare de apă și proteine în lichidul interstițial. Aceasta accentuează scăderea de volum și, astfel, se

instalează un cerc vicios, care, dacă nu este întrerupt, duce la exitus. Creşterea volumului sanguin cere un travaliu cardiac mărit (cu atât mai mult, cu cât viscozitatea sângelui este crescută) şi impune organismului un efort considerabil, cu pericolul în timp al unor accidente cardiace şi renale.

COMPOZIŢIA PLASMEI

Continuu supusă unor dereglări, prin aporturile anabolice şi deşeurile catabolice, plasma prezintă, totuşi, o compoziţie de fixitate remarcabilă. Nivelul fiecărui constituent al său este menţinut între limite de variaţie foarte strânse prin mecanisme reglatoare, al căror ansamblu a fost denumit de Cannon „homeostazie". În cadrul ei, orice modificare a proprietăţilor fizicochimice ale plasmei declanşează mecanisme fiziologice de reglare, care, corectând efectele, menţin echilibrul normal. Putem considera deci că, compoziţia plasmei reprezintă o formulă de adaptare a speciei la mediul extern.

Viteza reglărilor homeostatice este atât de rapidă, încât deseori nu pot fi observate. Se consideră compoziţia plasmei practic fixă, înţelegând prin aceasta că fiecare constituent plasmatic se găseşte la un nivel de echilibru dinamic, oscilând între limite foarte mici în jurul unei medii, care poate fi considerată ca cifra normalului cu suficientă rigurozitate. În ceea ce priveşte mărimea valorică a abaterii de la medie în cadrul normalului, aceasta este caracteristică fiecărui constituent în parte. Orice abatere apreciabilă de la limitele normalului este patologică.

Oricât ar fi de mare lista constituenţilor plasmatici, ea va fi totdeauna incompletă, deoarece unii compuşi cunoscuţi sunt nedozabili cu mijloacele de care dispunem în prezent, iar alţii nu sunt încă cunoscuţi şi nu apar decât odată cu metode de laborator mai noi şi mai sensibile.

Plasma are o compoziţie foarte asemănătoare cu cea a lichidului interstiţial, cu care se găseşte într-un continuu echilibru dinamic. Ea diferă însă apreciabil în compoziţie faţă de eritrocite, după cum, la rândul său, şi lichidul interstiţial diferă de celulele pe care le scaldă. În tabelul 11.I este prezentată schematic compoziţia plasmei (principalii constituenţi exprimaţi în cifre medii).

Schematic, constituenţii plasmatici se împart în trei mari grupe: anorganici, organici şi substanţe diverse.

CONSTITUENŢII ANORGANICI AI PLASMEI

Constituenţii anorganici ai plasmei sunt reprezentanţi de două grupe de substanţe: apa şi sărurile minerale.

APA

A. **Cadrul apei plasmatice în organism.** Volumul plasmatic şi variaţiile sale nu pot fi înţelese aparte de conţinutul în apă al întregului organism luat ca un întreg.

Reglarea volumului plasmatic este o chestiune de bilanț hidric, între spațiul circulator și cel interstițial, mergând uneori (în cazurile grave) până la cel intracelular.

Apa întregului corp (65—70% din greutatea corpului, adică aproape 50 de litri pentru un subiect de 70 kg) se împarte în 2 spații (compartimente sau sectoare) — intracelular și extracelular — ale căror conținu-

TABELUL 11.I

Compoziția plasmei sanguine

Apă . . . . . Solide	10%
Săruri	0,9 g/100 ml
Proteine	7,5 g/100 ml
Hemoglobină	—
Produși ai metabolismului proteic . .	43,550 mg/100 ml
Produși ai metabolismului lipidic . . .	1 100 mg/100 ml
Produși ai metabolismului hidrocarbonatelor	116 mg/100 ml
Bilirubină	1,1 mg/100 ml
Lipocromi	150 µg/100 ml
Vitamine	2 336 µg/100 ml

turi în electroliți sunt deosebite. În condiții normale, 2/3 din apa corpului se găsește în spațiul intracelular (35 litri=50% din greutatea corpului). Spațiul hidric extracelular se subîmparte în alte două spații: intravascular (3,5 litri=5% din greutatea corpului) și interstițial (10,5 litri=15% din greutatea corpului). Apa plasmatică reprezintă apa spațiului intravascular. În spațiul interstițial numai 50% din apă este biologic activă, adică ușor difuzibilă, restul de 40% este fixată în țesutul conjunctiv și în oase, iar 10% se află în așa-numitul „al III-lea spațiu" („apa transcelulară"), constituit din lichidele seroase ale cavității corpului, sucurile din tractul gastrointestinal, bilă, lcr etc.

Plasma conține 90% apă, iar elementele figurate ale sângelui conțin 65% apă.

Prin apa plasmatică, practic se înțelege apa sângelui aproape în totalitate și se poate în mod deliberat socoti apa plasmatică drept apa circulantă intravasculară.

Sectorul plasmatic, deși cel mai redus în comparație cu celelalte sectoare, nu este și cel mai puțin important deoarece constituie adevărata legătură dintre mediul extern și mediul intern, fiind, totodată și sectorul cel mai accesibil investigațiilor și terapeuticii.

B. **Funcțiile apei plasmatice.** Apa plasmatică este suportul fizic și chimic al tuturor componentelor plasmei. Spre deosebire de apa celulară

sau apa de constituție protoplasmatică, care este o apă legată (Nicloux), apa plasmatică este perfect liberă, adică o apă-vehicul, proprietate importantă, grație căreia întregul său volum este oferit ca spațiu vital electroliților, metaboliților, proteinelor etc.; în acest mod, apa plasmatică devine mediul dispers al coloizilor sanguini, mediul solvent al sărurilor, mediul de disociere electrolitică a ionilor, mediul de diluție a substanțelor metabolice (ana- și catabolice) și a secrețiilor etc. Dintre multiplele funcții pe care le îndeplinește plasma în organism, marea majoritate se realizează grație apei.

Apa este mediul în care se desfășoară toate fenomenele biochimice ale plasmei și ele ascultă de legile sale fizice: a) *legea soluțiilor*, în baza căreia difuziunea substanțelor dizolvate este reglată de concentrația lor moleculară și b) *legea disociației electrolitice* a substanțelor dizolvate, în baza căreia disocierea substanței dizolvate este supusă disocierii solventului (adică a apei).

Grație acestor legi, sectorul apos plasmatic poate fi considerat ca un sistem fiziochimic unitar, ale cărui legi se încadrează în legile generale de osmoză comune tuturor spațiilor apoase.

C. **Constanța hidrică a plasmei și mecanismul ei de reglare.** Perturbată continuu de aportul de substanțe din alimentație și de excrețiile tisulare, apa plasmatică se menține totuși foarte constantă. Sursele de apă care converg spre plasmă sunt în 24 de ore în jur de 1 250 ml apă ingerată ca atare, 1 000 ml apă provenită din alimente și 250 ml de apă energetică rezultată din metabolismul tisular. Cele 3 categorii de principii alimentare dau naștere, prin metabolizare, la următoarele volume de apă: 100 g proteine — 40 ml apă, 100 g hidrocarbonate — 60 ml apă, 100 g grăsimi — 100 ml apă. Acestui val hidric, care reprezintă peste 60% din întreaga cantitate de apă plasmatică și care ar produce tulburări mari dacă ar fi lăsat în voia sa, organismul îi răspunde deplasând aceeași cantitate, care se elimină prin emonctorii: rinichi (1 500 ml), piele (1 500 ml), intestin (100 ml), plămân (400 ml), pe zi. În general, prin căile extrarenale se elimină apa din alimente și jumătate din cea endogenă, iar pe cale renală jumătate din apa endogenă și întreaga cantitate de apă ingerată. Rinichiul este organul cel mai important în mecanismul menținerii constanței apei în sânge. De la ingestia unui volum de apă până la eliminarea acelorași molecule trece o săptămână, deși aparent în maximum 1—2 ore s-a eliminat prin rinichi un volum corespunzător. Este vorba de volume corespunzătoare și nicidecum de identitatea substanței excretate, față de cea ingerată. Eliminarea apei absorbite se efectuează fără ca masa plasmei să crească și fără să se producă hidremie. Homeostazia este asigurată în 30 de minute, prin trecerea apei ingerate în spațiile interstițiale, de unde altă apă se reîntoarce treptat (în câteva ore) în sânge și, în aceeași măsură, este eliminată prin rinichi. În tot acest timp, mecanismele secundare intră și ele în acțiune, tinzând să reducă ingestia de apă prin blocarea senzației de sete și să mărească pierderile de apă prin piele, respirație etc. Trecerea apei din plasmă în spațiile lacunare are rolul unei supape, care amortizează șocul hidric brutal de diluție și îl transformă în proces lent, adaptat la viteza eliminării renale, debarasând, în același timp, țesuturile de produsele metabolismului celular.

În linii mari, tulburările echilibrului hidric plasmatic îmbracă două forme: tendința de hipotonie și tendința de hipertonie. În ultimă instanță deci, constanța hidrică a plasmei este asigurată prin două mecanisme: cel care luptă împotriva hipotoniei (hiperhidratării) și cel care luptă împotriva hipertoniei (deshidratării). Am văzut mai sus mecanismul de neutralizare a hiperhidratării. Mecanismul de neutralizare a tendinței de creștere a concentrației plasmei prin scăderea conținutului în apă (diarei profuze, vărsături, sudori profuze hemoragii etc.), mecanismul care intră în joc face ca șocul de deshidratare să fie suportat tot de spațiul interstițial, care cedează plasmei în circa 60 de minute o parte din apa sa, păstrându-i-se astfel izohidria. În acest timp, mecanismele secundare produc la nivelul emonctoriilor o scădere a pierderilor apoase, iar pe cale nervoasă o senzație puternică de sete, pentru a mări astfel ingestia de lichid.

Așadar, când survin condiții de deshidratare plasmatică, arborele circulator își recapătă apa din spațiile extravasculare; în cazul invers, surplusul îl trimite tot acolo. În felul acesta se stabilește o balanță, iar volumul apei plasmatice rămâne remarcabil de constant.

SĂRURILE MINERALE

Compartimentele hidrice ale organismului, jocul lor independent și interdependent și mai ales stabilitatea spațiului hidric plasmatic nu s-ar putea realiza fără un schelet de susținerea apei. Într-adevăr, apa nu este independentă în migrațiile sale în organismul uman, ci este spațiul de expansiune al electroliților și proteinelor, pe care-i conține în stare de soluție și, respectiv, suspensie. Electroliții sunt cei ce formează, în cea mai mare parte, scheletul de susținere a apei extracelulare — aproape exclusiv în ceea ce privește apa interstițială și în majoritate în privința apei intravasculare. Apa extracelulară este, deci, aproape exclusiv la dispoziția electroliților, asigurându-le, în primul rând, mediul și totodată volumul necesar desfășurării acțiunii lor și urmându-i în deplasările lor după legi precise și supuse unor mecanisme stricte de reglare. În ceea ce privește apa intracelulară, lucrurile se inversează, în sensul că scheletul acesteia este format în majoritate de proteinele celulare și mai puțin de electroliți.

A. **Electroliții plasmei.** Mineralele prezente în plasmă îndeplinesc în organism numeroase funcții:

a) sunt constituenții esențiali ai celulelor;

b) intră în compoziția fermenților respiratori, a enzimelor și hormonilor;

c) intră în constituția scheletului;

d) reglează permeabilitatea membranelor;

e) reglează excitabilitatea neuromusculară;

f) condiționează osmoza apei, produc presiunea osmotică și mențin echilibrul osmotic al plasmei;

g) reglează echilibrul acidobazic al plasmei.

Dintre aceste funcții numai ultimele două vor fi discutate, ele fiind strâns legate de plasmă.

Mineralele plasmatice sunt toate dizolvate în apă și, ca atare, disociate în stare de electroliți sau ioni: Cl^-, I^-, CO_3H^-, SO_4H^-, PO_4H^{2-}, Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}.

Importanța principalilor ioni este amintită în mod succint în cele ce urmează:

— Cl=ionul metabolismului apei.

— Na=ionul metabolismului apei și bază alcalină a plasmei.

— K=ionul transmisiei nervoase și reglatorul excitației cardiace.

— Ca=ionul reglator al permeabilității membranelor și reglator al excitației nervoase, al coagulării, al osificării etc.

— Fe=fermenți respiratori (Hb, mioglobină, citocrom).

— Cu=auxiliar și întăritor al acțiunii fierului.

— Mg=ionul fundamental al enzimelor oxidante.

— I=ionul hormonului tiroidian.

— PO_4H^{2-}=radicalul osificării, al acizilor nucleici și tuturor fosfoproteinelor și fosfolipidelor, ionul energeticii musculare, al enzimelor oxidante.

— CO_3H^-=radicalul catabolismului celular.

— SO_4H^-=radicalul conjugărilor antitoxice.

Dintre aceștia, câțiva ioni se găsesc în plasmă în cantități foarte mici: Cu (100μg/100 ml), Fe (100 μg/100 ml) și I (10 μg/100 ml). Acești ioni nu au influență asupra schimburilor hidroosmostice vasculointerstițiale. După cum sunt purtători de sarcini pozitive sau negative, ionii sunt anioni și cationi. Concentrația lor în plasmă, exprimată gravimetric și în miliechivalenți, este prezentată în tabelul 11.II.

Există diferențe remarcabile în ceea ce privește concentrația ionilor în plasmă și în eritrocite. În privința anionilor în eritrocit — față de plasmă — există aproximativ jumătate din clor (180 mg/100 ml), extrem de puțin CO_3H, ceva mai mult SO_4H și de 20 de ori mai mult PO_4H; iar în privința cationilor, foarte puțin Na (30 mg/100 ml), foarte mult K

TABELUL 11.II

Concentrația ionilor în plasmă
(după Jeanneret-Rosenmund-Esselier)

	Anioni (—)					Cationi (+)				
	Cl^-	CO_3H^-	SO_4H^-	PO_4H^{2-}	Total	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Total
mg/100 ml	365	150	200	100	815	327	20	10	2,5	359,5
mEq/l	103	27	1	2	133	142	5,1	4,9	2.	154

(450 mg/100 ml), extrem de puțin Ca (1 mg/100 ml) și destul Mg (5 mg/100 ml). Majoritatea electroliților plasmei este reprezentată de anionul clor și cationul sodiu (moderat Ca), în timp ce cei eritrocitari sunt reprezentați de anionul PO_4 și cationul K (moderat Mg). Compoziția chimică atât de diferită între plasmă și globul este efectul membranei celulare, care, prin proprietățile sale vitale, se lasă selectiv străbătută de anumiți ioni. Fiziologia intimă a acestui proces de permeabilitate selectivă, determinismul și legile sale sunt la ora actuală suficient cunos-

cute pentru a face posibilă o explicație unanim acceptabilă. Cercetările cele mai recente, pe bază de K și Na radioactivi, arată că ambii ioni pătrund în globul cu aceeași ușurință, dar Na părăsește celula pe măsură ce a intrat în ea, în timp ce K se fixează pe Hb și proteine și rămâne în celulă dislocând continuu Na. Alături de echilibrul de membrană menționat, mai intervin, așadar, și alte procese legate de activitatea eritrocitului și determinate de funcția sa specializată.

Este locul aici să se amintească noțiunea de „miliechivalent electrochimic". Așa cum reiese din tabelul 11.II, unde concentrațiile ionilor sunt exprimate la 100 ml plasmă, rezultă că anionii fac împreună 815 mg/100 ml, iar cationii doar 359,5 mg/100 ml. Această diferență mare ar da impresia că plasma nu ar fi neutră, ci încărcată intens electronegativ (acidoză). În realitate, această impresie este complet eronată deoarece toți ionii plasmatici își exercită funcțiile lor în perfectă electro- și osmoneutralitate. Eroarea provine din faptul că, conform unei tradiții clasice, cantitățile ionilor sunt exprimate gravimetric în miligrame de substanță la 100 ml plasmă, când, de fapt, avem de-a face nu cu săruri, ci cu ioni, deci cu elemente disociate, care se combină și se neutralizează între ele nu pe bază gravimetrică, ci de echivalență electrochimică. Iată de ce, dacă se schimbă exprimarea clasică gravimetrică, în cea modernă de echivalență electrochimică, lucrurile capătă alt aspect. Se numește miliechivalent electrochimic cantitatea în miligrame dintr-un element la 1 litru, înmulțită cu valența și împărțită la greutatea atomică ($mEq = \frac{mg/l \times valența}{greut.\ atomică}$). De exemplu, calciul care se găsește în plasmă în cantitate de 100 mg/l este bivalent și are greutate atomică 40,07; transformat după noul sistem, devine: $\frac{100 \times 2}{40,07} = 4,9$ mEq/l. Tot astfel, clorul, care se găsește în cantitatea de 3 650 mg/l, este monovalent și are greutatea atomică 35,4; transformat după principiul miliechivalenței devine: $\frac{3\,650 \times 1}{35,4} = 103$ mEq/l. Sau, de pildă, sodiul, care se găsește în plasmă în cantitate de 3 260 mg/l, este monovalent și are greutate atomică 23; transformat și el după același sistem devine: $\frac{3\,270 \times 1}{23} = 142$ mEq/l ș.a.m.d.

Un exemplu sugestiv care ilustrează diferența între notația gravimetrică și cea în miliechivalenți îl dă Mach: pentru o soluție în care se află 10,5 g Cl^- și 6,9 g Na^+ corespondența gravimetrică duce la impresia că nu tot clorul este combinat cu Na ca NaCl, ci ar mai rămâne clor liber, ceea ce este inexact. Introducând aceste date în ecuația de miliechivalență se obține:

$$Cl^- = \frac{10\,500\ mg‰ \times 1}{35} = 300\ mEq/l$$

$$Na^+ = \frac{6\,900\ mg‰ \times 1}{23} = 300\ mEq/l$$

Așadar, întreaga cantitate de ioni Cl este combinată cu întreaga cantitate de ioni Na, soluția fiind în perfectă stare de electroneutralitate, fapt care reiese clar din exprimarea concentrației ionilor în miliechivalenți la litru (fig. XI.2).

Revenind la tabelul 11.II și comparând datele gravimetrice cu cele ale miliechivalenței se obțin diferențe aparent destul de mari, reieșind, de exemplu, între altele, că SO_4H este foarte puțin (gravimetric părea mult), PO_4H este dublu cât SO_4H (gravimetric părea jumătate), dar foarte puțin în comparație cu CO_3H; K și Ca sunt egale (gravimetric K părea dublul Ca) și, în fine, că Na este mai mult decât Cl (gravimetric este invers).

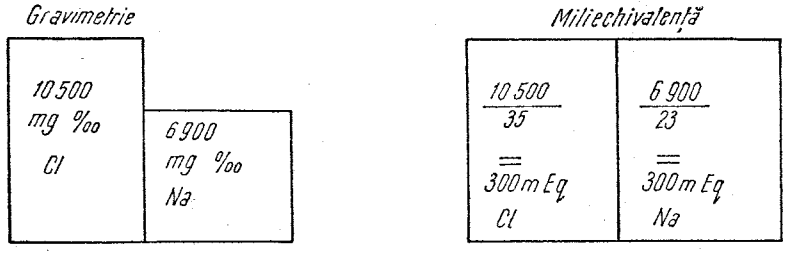


Fig. XI.2. — Corespondența dintre exprimarea gravimetrică și cea în miliechivalenți (după Mach).

Dacă se face și aici bilanțul anionilor cu al cationilor rezultă 133 mEq anioni pentru 154 cationi, diferență care ne-ar tenta să afirmăm că plasma, totuși, nu este electric neutră, ci este încărcată pozitiv (alcaloză), adică exact opusul impresiei pe care ne-o dădea calculul gravimetric. În realitate, plasma mai conține două corpuri încărcate slab electronegativ, care, deși nu sunt electroliți, totuși, din punct de vedere electrochimic, trebuie asimilate grupei anionilor, și anume: acizii organici și proteinele, care, deși amfotere, în mediul ușor alcalin al sângelui (pH=7,35), au inhibată disociația funcției bazice și potențializată disociația funcției acide. Echivalența lor electrochimică este de 5 mEq/l, pentru primii și 16 mEq/l pentru ultimele. Adunând acești 21 mEq la cei 133 mEq de mai sus se obțin 154 mEq/l pentru anioni, ceea ce neutralizează perfect pe cei 154 mEq/l cationi, demonstrând perfecta electroneutralitate a plasmei. Tabloul complet al situației ionice a plasmei comparat cu cel al lichidului interstițial (calculat pe aceeași bază) capătă aspectul prezentat în fig. XI.3.

Din schemele lui Gamble rezultă trei concluzii importante cu privire la echilibrul osmotic extracelular, și anume:

a) neutralitatea electrolitică, atât a plasmei, cât și a lichidului interstițial; într-adevăr, cei 308 mEq (din plasmă) sunt repartizați în două grupe egale a 154 mEq, atât pentru anioni, cât și pentru cationi, iar cei 304 mEq/l din lichidul interstițial sunt la fel divizați egal în câte 152 mEs/l pentru anioni și cationi;

b) structură osmotică foarte asemănătoare a plasmei și lichidului interstițial, fapt care explică ușurința schimburilor ionice între aceste două componente ale compartimentului osmotic extracelular, spațiul interstițial fiind supapa homeostazică a celui plasmatic, față de orice tendință de dereglare;

c) rolul deosebit jucat de proteinele plasmatice, care, datorită disocierii lor ușor acide (din cauza pH-ului ușor alcalin — 7,35 — compo-

nenta bazică a funcţiei amfotere este inhibată şi se disociază de componenta acidă), deci electronegative, permit echilibrarea balanţei ionice în sensul electroneutralităţii plasmei, îndeplinind totodată funcţii importante în schimburile hidrice dintre sânge şi ţesuturi.

B. **Osmoza, presiune osmotică, echilibru osmotic.** Prin osmoză se înţelege trecerea apei şi a oricărui solvent printr-o membrană semipermea-

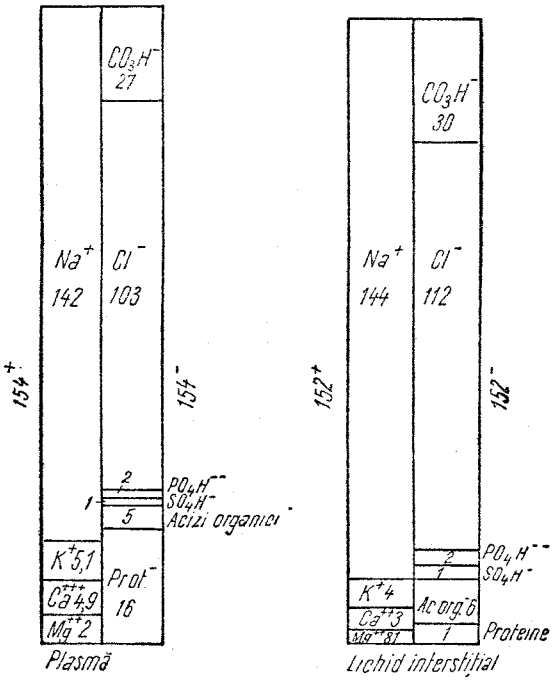


Fig. XI.3. — Electroliţii plasmei şi lichidului interstiţial în miliechivalenţi (după Gamble).

bilă, sensul fiind de la soluţia cu concentraţie mai redusă către cea cu concentraţie mai ridicată. Prin presiune osmotică, în general, se înţelege acea presiune pe care o dezvoltă o soluţie pentru a realiza intrarea solventului pur în ea, printr-o membrană semipermeabilă (adică permeabilă numai pentru solvent, nu şi pentru substanţa dizolvată). Este ca şi cum soluţia ar suge solventul pur din jurul ei, cu o forţă proporţională cu concentrarea sa în electroliţi, comparativ cu cea a mediului înconjurător. Presiunea osmotică mai poate fi definită şi ca forţa exercitată de o parte şi alta a unei membrane semipermeabile, care le separă, de către două lichide ce conţin cantităţi inegale de molecule dizolvate.

Asemenea procese sunt valabile cu strictețe pentru membranele semipermeabile de laborator. Deoarece membranele organismului animal sunt permeabile nu numai pentru apă, ci şi pentru majoritatea electroliţilor solviţi în ea, ele nu mai corespund definiţiei de membrane semipermeabile perfecte şi nu mai respectă cu rigurozitate aceste legi. Fiecare umoare a organismului trebuie, deci, considerată ca un sistem

aparte, în sânul căruia se aplică legile fizice generale ale soluțiilor, dar raporturile de schimburi între aceste umori sunt comandate de natura barierelor de separație, care pot fi diferite după funcțiile îndeplinite (membrană eritrocitară, perete capilar, membrană celulară, barieră hematoencefalică etc.). Totuși, pentru că membranele animale sunt mai ușor permeabile pentru apă — factorul comun al tuturor umorilor organismului — decât pentru electroliți, compararea a două presiuni osmotice dintr-o parte și alta a unei membrane indică direcția difuziunii apei, și anume, totdeauna din zona hipoosmotică (concentrație mică în săruri), spre cea hiperosmotică (concentrație mare în săruri), ascultând în aceasta de legile generale ale echilibrului osmotic (care tinde să niveleze diferențele).

Cu alte cuvinte, în organismul animal — și aceasta este în special valabil pentru plasmă — direcția de difuziune osmotică a apei se face din zona cu concentrare mare în apă (respectiv mică în săruri) spre cea cu concentrație mică în apă (respectiv mare în săruri), menținând, astfel, constantă presiunea de o parte și de alta a barierei (fie că este vorba de membrană eritrocitară, fie de peretele capilar etc.). Efectul acestei egalități este important de urmărit, dacă se ia în considerare, bunăoară, că în plasmă circulă în permanență eritrocite și că orice tulburare în presiunea osmotică a plasmei are repercusiune asupra eritrocitelor tocmai pe baza principiului echilibrului osmotic. Ori de câte ori presiunea osmotică a plasmei este mai mare decât a eritrocitelor, acestea cedează apă și efectul este ratatinarea lor; invers, când presiunea osmotică a plasmei este mai mică decât a eritrocitelor, acestea primesc apa și se umflă. În ambele cazuri, funcția lor este afectată, dar până la un anumit grad fenomenul este reversibil; dincolo de un anumit prag se compromite însăși viața globulului (osmonocivitate). Este un exemplu, printre altele, care explică, pe de o parte, de ce constanța presiunii osmotice a plasmei trebuie să fie dintre cele mai fixe, iar pe de alta, ilustrează marele rol pe care îl joacă în menținerea acestei constanțe spațiul interstițial cu care spațiul plasmatic procedează la toate schimburile osmotice, atât de surplus de apă (cedare), cât și de lipsă (admisie), pentru ca șocurile hidroosmotice să nu lezeze eritrocitele. Se confirmă încă odată afirmația că spațiul interstițial este supapa de siguranță și amortizorul violențelor hidroosmotice ale spațiului plasmatic.

Presiunea osmotică a plasmei este de 5,852 mmHg la 37°C (fiind dezvoltată numai de cristaloizi) și corespunde unui punct crioscopic (Δ) de 0,56°C și unei concentrații moleculare de NaCl 8,5%. Ea este una dintre cele mai fixe și riguroase constante ale plasmei umane.

C. **Echilibrul de membrană** (presiunea coloidosmotică). Din cele expuse rezultă că presiunea osmotică a plasmei ar trebui să fie aproape egală cu cea a lichidului interstițial, ceea ce însă nu corespunde realității. Plasma are o presiune osmotică ceva mai mare ca lichidul interstițial, datorită faptului că ea conține o cantitate apreciabilă de proteine, substanțe coloidale disociabile în ioni difuzibili și nedifuzibili. După Gibbs și Harris, prezența de ioni coloidali nedifuzibili într-o soluție are o mare influență asupra repartiției ionilor difuzibili (cristaloizi), în sensul că tinde să îndepărteze din soluția lor ionii difuzibili cu încărcătură electrică de același semn și atrage pe cei de semn contrar

(de exemplu, în plasmă este mai puțin Cl^- și CO_3H^- decât în lichidul interstițial, dar mai mult K^+, Ca^{2+} și Mg^{2+}, ambele lichide fiind însă neutre electric, căci pentru fiecare din ele, luate separat, suma cationilor lor este egală cu a anionilor lor). Acest fapt duce, conform legii echilibrului de membrană a lui Donnan, la o inegală repartiție a numărului ionilor de o parte și de alta a membranei, în sensul că, de partea unde sunt proteinele, numărul total de ioni este ceva mai mare decât de partea cealaltă (de exemplu, plasma are 154 mEq/l, iar lichidul interstițial 152 mEq/l). Consecința acestui fapt este că presiunea osmotică a plasmei (care ținea de numărul de ioni în total) este cu puțin mai mare decât cea a lichidului interstițial (4 mmHg).

Pe de altă parte, proteinele, ca orice substanță coloidală, dezvoltă și ele o presiune osmotică proprie, denumită de Starling coloidosmotică sau oncotică; ea nu participă la presiunea osmotică a plasmei și este de circa 26 mmHg (35 cm apă). Această valoare este foarte mică în comparație cu cele 7,7 atmosfere dezvoltate de cristaloizi (5 852 mmHg), dar efectele sale sunt foarte importante. Prezența proteinelor în plasmă face ca, de o parte și de alta a membranei capilare, cele două presiuni osmotice să nu fie egale. De partea plasmei există o presiune osmotică ceva mai mare și, în plus, se adaugă și presiunea coloidosmotică a proteinelor, ceea ce face ca balanța să încline în favoarea plasmei, deoarece totalul presiunilor plasmei — osmotică plus coloidosmotică — întrece presiunea osmotică a lichidului interstițial (cu 30 mmHg).

Ar urma, ca pe baza legilor osmozei, trecerea apei prin membrana capilară să aibă loc numai într-un singur sens, și anume: din spațiul interstițial spre plasmă (adică spre lichidul cu presiune osmotică mai mare). Or, în realitate, trecerea are loc în ambele sensuri cu aceeași ușurință. Aceasta se explică prin intrevenția unui alt factor, și anume, „presiunea hidrostatică a sângelui în capilare".

Plasma este supusă pe tot traiectul arborelui circulator la presiuni hidrostatice, care merg descrescând de la inimă (120 mmHg) la capilarele arteriale (42 mmHg). La acest nivel, diferența dintre presiunile osmotice ale plasmei și lichidului interstițial este în jur de 30 mmHg în favoarea plasmei (26+4). În sens contrar se exercită, însă, o presiune hidrostatică de 42 mmHg și efectul este conform forței mai mari, adică trecerea are loc din capilar spre spațiul interstițial. La capătul venos al capilarului, presiunea hidrostatică este abia 16 mmHg, iar presiunea coloidosmotică 30 mmHg, ceea ce face ca trecerea să aibă loc invers, de la spațiul interstițial spre capilar. Jocul acesta alternant, la cele două capete ale capilarului, al cuplului celor două presiuni de sens contrar este de o importanță covârșitoare pentru organism, deoarece numai astfel se asigură permanent și fără greutate schimbul sânge—țesuturi și viceversa, condiție esențială a bunei funcționări a organelor și, în esență, a vieții întregului organism (fig. XI.4).

D. **Echilibrul acidobazic: pH; rezerva alcalină.** Una din constantele importante ale plasmei este pH-ul său, care este 7,35 (pH sânge=pH plasmă). Acțiunea celulară de fiecare clipă ar putea supune acest pH la modificări apreciabile, care ar degrada eritrocitele: modificările sunt însă instantaneu corectate, astfel că valoarea pH-ului să rămână constantă. Aceasta are loc datorită unor mecanisme bazate pe sisteme tampon,

adevărate amortizoare chimice împotriva acidificării sau alcalinizării sângelui.

Principial, un sistem tampon este compus, după Henderson şi Hesselbach, din raportul unei sări faţă de acidul slab, care i-a dat naştere. Acest raport reprezintă, de fapt, echilibrul acidobazic al respectivei soluţii şi constanţa sa garantează fixitatea pH-ului respectiv. Sângele este prevăzut să reziste mai mult împotriva acidităţii decât alcalinităţii, din

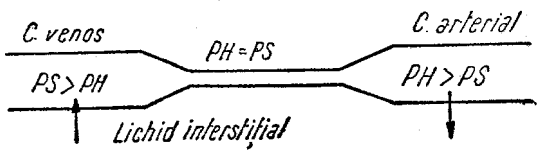


Fig. XI.4. — Circulaţia capilaro-interstiţială (după Starling). PH = presiune hidrostatică; PS = presiune Starling.

cauză că mai toate procesele fiziologice din organism produc substanţe de natură acidă. Se poate afirma că torentul circulator este traversat permanent de un curent de acidoză şi că aceasta este, în principal, gazoasă (CO_2), în timp ce factorii de alcaloză sunt rari, reprezentaţi prin aportul alimentar de alcaline. Limita compatibilă cu viaţa a acidităţii este pH=7, iar a alcalinităţii, pH=7,8. În totalitate, sângele are o putere tampon deosebită: 70% din aceasta aparţine eritrocitelor şi este specializată pentru acidul carbonic (fapt care face posibile schimbările de CO_2 şi O_2 la nivelul plămânului şi al ţesuturilor), iar restul aparţine plasmei şi este specializată pentru toţi ceilalţi acizi rezultaţi din metabolismul celular sau din absorbţia intestinală.

Sistemele tampon ale plasmei sunt în număr de trei, şi anume, în ordinea importanţei lor:

$$\frac{CO_3H_2}{CO_3HNa}\ ;\ \frac{PO_4H_2Na}{PO_4HNa_2}\ ;\ \frac{PrH\ \text{(proteine acide)}}{PrNa\ \text{(proteinat de sodiu)}}$$

Cel mai important sistem tampon este cel al carbonaţilor; celelalte două sisteme sunt de rezervă pentru cazurile când agresiunea acidă ar fi prea intensă şi ar depăşi posibilităţile de tamponare ale primului sistem. Ori de câte ori un acid pătrunde în sânge (de exemplu, acidul lactic în exerciţiul muscular), el reacţionează cu sarea sistemului tampon. Aici el se combină cu baza (Na), devenind astfel inactiv, şi cu această ocazie deplasează radicalul acid (CO_3H) transformându-l în acid liber în plasmă (CO_3H_2). Acest mod de reglare automată prin tamponare nu este decât provizorie, pentru a nu se modifica pH-ul; cercetând, în exemplul dat, raportul Henderson-Hesselbach, se vede că scade numitorul şi creşte numărătorul, fapt care ar duce ulterior la scăderea pH-ului. Intrevine însă imediat emonctoriul de ajutor, plămânul, care elimină CO_3H_2 în exces, ca CO_2 şi H_2O, astfel că cifrele se menţin la normal. Aşadar, graţie acestui sistem, orice acid tare pătruns în plasmă este neutralizat pe loc, în locul său punându-se în libertate, din sistemul tampon, CO_3H_2, acid slab, care, la nivelul plămânului, prin acţiunea anhidrazei carbonice, este transformat în CO_2 şi H_2O şi se elimină. Pentru cazul alcalinităţii, fenomenul este altul, în sensul că, crescând numitorul din raportul Henderson şi, implicit, pH-ul, ceea ce poate duce

la alcaloză, intervine, dintre emonctorii, rinichiul, care elimină bicarbonatul în exces, menținând valorile la normal. Așadar plămânul este organul emonctoriu de ajutor în combaterea acidozei, iar rinichiul în combaterea alcalozei.

Întrucât bicarbonatul de sodiu este principala armă a plasmei împotriva acidității. Van Slyke l-a denumit „rezerva alcalină", noțiune unanim acceptată. Determinarea rezervei alcaline exprimă imediat tulburarea care a avut loc, chiar dacă între timp ea a fost tamponată și, ca atare, o testare a pH-ului nu ne-ar indica nimic. Deci, pentru a cunoaște la un moment dat situația echilibrului acid-bază în plasmă se măsoară rezerva alcalină. Aceasta din urmă este scăzută în acidoze (până la 40 de volume CO_2) și crescută în alcaloze (până la 80 volume de CO_2) (normal: 60 volume CO_2).

CONSTITUENȚII ORGANICI AI PLASMEI

Cuprind două clase de elemente, după cum conțin sau nu azot în molecula lor.

A. **Constituenții neazotați** sunt numeroși, cei mai importanți fiind prezentați în tabelul 11.III.

TABELUL 11.III

Constituenții organici neazotați ai plasmei

Elemente ale metabolismului lipidic	1 100 mg/100 ml
Lipide totale, din care:	550—800 mg/100 ml
grăsimi neutre	100—250 mg/100 ml
acizi grași liberi	50 mg/100 ml
trigliceride	130—180 mg/100 ml
Colesterol total, din care:	150—250 mg/100 ml
HDL-colesterol	$\geqslant$35 mg/100 ml
LDL-colesterol	$\leqslant$150 mg/100 ml
VLDL-colesterol	50 mg/100 ml
Fosfatide (lecitină și cefalină)	150—250 mg/100 ml
Elemente ale metabolismului hidrocarbonatelor	**116 mg/100 ml**
Glucoza	70—110 mg/100 ml
Acid lactic	10—15 mg/100 ml
Acid piruvic	0,4—0,75 mg/100 ml
Acid citric	1,7—2,7 mg/100 ml
Acid oxalic	1—5 mg/100 ml
Acid acetilacetic și β-hidroxibutiric	3—6 mg/100 ml
Alcool etilic	3—4 mg/100 ml

Dintre aceştia un loc primordial îl ocupă glucoza. Rolul său este fundamental în nutriţia ţesuturilor şi organelor. Glucoza este sursa glicogenului hepatic şi muscular şi tot ea este şi combustibilul energetic al tuturor celulelor organismului. Limitele strânse între care este realizată concentraţia sa în plasmă, apropie constanţa glicemiei de aceea a presiunii osmotice şi pH-ului şi sugerează existenţa unei adevărate homeostazii glucidice. Glucoza este numitorul comun biologic al tuturor moleculelor glucidice; polizaharidele din alimentaţie nu se pot absorbi decât ca glucoză, iar polizaharidele de depozit (glicogen) nu se pot utiliza decât tot ca glucoză. Printre organele care iau parte la mecanismul menţinerii constante a concentraţiei glucozei în plasmă, citãm: ficatul, muşchii, pancreasul, hipofiza şi suprarenalele.

B. **Constituenţii azotaţi.** Această clasă se subîmparte, după natura azotului din molecula constituenţilor, în azot neproteic şi azot proteic.

1) *Azotul neproteic* este reprezentat de substanţe azotate cristaloide, nedisociabile, care sunt: ureea, amoniacul, creatina, creatinina, acidul uric, acizii aminaţi, toţi produşi azotaţi, traducând prin prezenţa lor în plasmă dublul curent, de aport nutritiv şi de excreţie, care se încrucişează permanent în mediul intern plasmatic (tabelul 11.IV).

TABELUL 11.IV

Produşi ai metabolismului proteic incluşi în azotul total neproteic (43,550 mg/100 ml plasmă)

Produşi ai metabolismului proteic	Concentraţia
Uree	20—50 mg/100 ml
N aminoacidic	3 mg/100 ml
Acid uric	2,5—6,5 mg/100 ml
Creatină + creatinină	1,2 mg/100 ml
Amoniac	30—70 µg/100 ml

Dintre metaboliţii de aport şi utilizare fac parte acizii aminaţi, iar restul compuşilor azotaţi sunt metaboliţi de deşeu, pe cale de excreţie.

Spre deosebire de alte substanţe, metaboliţii de deşeu au o variaţie destul de largă în ceea ce priveşte concentraţia lor în plasmă, dovedind lipsa lor de importanţă pentru fenomenele vitale ale ţesuturilor şi dependenţa lor de condiţiile de alimentaţie. Din acest punct de vedere se poate afirma că plasma reprezintă oglinda regimurilor nutritive ale organismului respectiv.

2) *Azotul proteic.* Această clasă cuprinde proteinele circulante sau plasmatice. Cu o masă globală care reprezintă 4% din sângele total şi 80% din reziduul uscat al plasmei, proteinele plasmatice participă cu rol deosebit în majoritatea proceselor vitale ale organismului. Dat fiind că toate schimburile biologice dintre mediul intern şi ţesuturi, pe de o parte, şi mediul intern şi mediul extern, pe de alta, sunt, în primul rând, fenomene de suprafaţă şi, ţinând seama că structura lor coloidală

polidispersă le conferă o suprafață imensă, se poate deduce extraordinara lor importanță în toate procesele organismului. Simpla comparație a suprafeței eritrocitelor (3 000 m^2) cu cea a alveolelor pulmonare (150 m^2) și a proteinelor plasmatice (150 000 m^2) oferă cifre elocvente în acest sens. Deși neomogene, prezentând fracțiuni cu caracteristici individuale bine stabilite, totuși proteinele plasmatice formează un tot biologic bine conturat, fapt care le conferă, după Svensson, individualitate de țesut, cu o economie, un bilanț și homeostazie proprii.

Fracțiunile proteice din plasmă. Clasificarea proteinelor plasmatice principale în trei grupe este clasică, cercetările moderne adăugând numai existența unor fracțiuni și subfracțiuni în grupe. Aceste trei grupe sunt: fibrinogenul, globulinele și albuminele. Separarea și studiul lor au fost dificile din cauza obținerii cu greutate a unor constante fizice de individualizare precisă, așa cum o au diferitele corpuri (greutatea moleculară, punct de topire, puritate, cristalizare etc.). Din această cauză, metodele de cercetare, laborioase și complexe, merg pe mai multe linii: precipitări saline, fracționări alcoolice, ultracentrifugare, electroforeză, cromatografie etc. Fiecare din aceste metode dă rezultatele ei interesante, dar care, comparate cu ale celorlalte, nu se suprapun, probând că separarea grupelor proteice nu este încă perfectă.

Multe din proteinele plasmei conțin hidrocarbonate fixate de aminoacizii lanțurilor polipeptidice (galactoză, manoză, fucoză, acetil-hexozamină). Proteinele care conțin o fracțiune mai mare hidrocarbonată ce le conferă un profil deosebit poartă numele de *glicoproteine* și se pun în evidență cu coloratia PAS.

Alte proteine *(apoproteine),* care fixează temporar lipide, sunt *lipoproteinele* ce migrează electroforetic ca α- și β-globulină și reprezintă 8—12% din totalul proteinelor plasmei. După cum migrează în câmpul electric ele sun deosebite în α_1-, α_2- și β-lipoproteine. Ele au o compoziție diferită în apoproteine și lipide și au fost separate prin ultracentrifugare în 4 fracțiuni cu proprietăți fizice, chimice și imunologice proprii: chilomicronii, LDL *(low density lipoproteins),* VLDL *(very low density lipoproteins)* și HDL *(high density lipoproteins);* a mai fost descrisă și o fracțiune IDL *(intermediate density lipoproteins)* numită și „rest VLDL".

În sindromul de colestază a mai fost identificată lipoproteina Lp-x.

Rolul principal al lipoproteinelor este de transportor de lipide, în special acizii grași și colesterolul, care sunt vehiculați sub formă esterificată.

Cantitativ, pentru un total mediu de proteine plasmatice de 75 g/100 ml se admite, în general, că fibrinogenul reprezintă 3 g/100 ml, globulinele 29 g/100 ml și albuminele 43 g/100 ml.

Fibrinogenul este proteina a cărei prezență sau absență din plasmă definește plasma sau serul. Are o greutate moleculară de aproximativ 400 000 d și moleculă liniară lungă de 700 Å, cu diametrul de 38 Å. Este insolubil în apă, dar solubil în diferite concentrații saline. Este precipitabil în soluție semisaturată de NaCl sau sulfat de amoniu saturat 25%. Temperatura sa de coagulare este de 55°C în soluție neutră. Fibrinogenul este unic în genul său în cadrul proteinelor plasmatice, în sensul că se transformă ca urmare a acțiunii trombinei în fibrină insolubilă la tem-

peraturile de 37°, 20° şi chiar aproape de 0°C. Acest proces stă la baza coagulării sângelui, cheagul constând dintr-o reţea de fibrină ce cuprinde în ochiurile ei elementele figurate. Lichidul supernatant, exprimat din acest cheag, este serul care conţine ca proteine numai globuline şi albumine. Fibrinogenul nu are putere coloidosmotică. Rolul principal al fibrinogenului este în procesul de coagulare. Tot el este responsabil de accelerarea vitezei de sedimentare a eritrocitelor, atunci când este în cantitate mai mare decât normal.

Fibrinogenul, ca şi fibrina, este implicat activ în procesele specifice de adeziune celulară pe calea integrinelor celulare.

El este, de asemenea, un factor mitogenic pentru precursorii hematopoietici, potenţând efectul mitogenic al IL-3 recombinant asupra precursorilor imaturi ce dau naştere în culturi la clone eritroide, granulomonocitare şi megacariocitare ce se pot diferenţia şi prolifera.

Albuminele reprezintă fracţiunea cea mai mare a proteinelor plasmatice sau serice. Sunt mult mai solubile decât celelalte fracţiuni, au o greutate moleculară de 69 000 d şi punctul izoelectric la pH 5 (20°C). Ele precipită în sulfat de amoniu soluţie semisaturată. Sunt cele mai omogene şi au putut fi obţinute (unele) în formă cristalină. Prin electroforeză, nu se pot izola subfracţiuni, iar prin determinări chimice s-a văzut că cuprind o glicoproteină. Rolul lor de bază priveşte asigurarea schimburilor de apă dintre sânge şi ţesuturi, datorită presiunii coloidosmotice pe care o dezvoltă. Totodată, ele au o funcţie de transport datorită capacităţii de a fixa temporar diferite substanţe (medicamente, hormoni).

Globulinele reprezintă fracţiunea cea mai heterogenă a proteinelor plasmatice. Sunt constituite din varietăţi de proteine cu caracteristici generale comune, dar cu subvarietăţi, care se individualizează destul de net. Precipită cu o soluţie saturată de sulfat de amoniu (50 ml la 100 ml plasmă). În cadrul acestei precipitări se disting două tipuri: *euglobulinele* şi *pseudoglobulinele*. Primele precipită cu o soluţie de sulfat de amoniu saturată 35 ml/100 ml plasmă şi nu sunt solubile în apă. Celelalte precipită cu o soluţie de sulfat de amoniu saturată 45 ml/100 ml plasmă şi sunt solubile în apă. Această solubilitate deosebită este singurul caracter ce le deosebeşte, iar Sörensen consideră că au aceleaşi funcţii. Electroforetic, după Tiselius, în grupul globulinelor se disting mai multe fracţiuni, individualizate după viteza lor de migraţie către anod:

— α-globuline (cu două subdiviziuni: α_1 şi α_2);

— β-globuline;

— γ-globuline [cu trei subdiviziuni: γG (IgG), γA (IgA) şi γM (IgM)].

α_1-*Globulinele* au mai multe componente:

— α_1-seromucoidul (oresomucoid), prezent în ser în cantitate de 65—75 mg/100 ml, este proteina plasmatică cea mai bogată în hidrocarbonate (40%) şi având o greutate moleculară mică (44 000) exercită o presiune oncotică notabilă. El este crescut în diferite boli: infecţii acute şi cronice, colagenoze, neoplazii, diabet şi în cursul sarcinii;

— α_1-lipoproteina (HDL), cu afinitate crescută pentru fosfolipide;

— alte componente: α_1-glicoproteine (α_1-antitripsina), 4,6 S-postalbumina, α_1-glicoproteina uşor precipitabilă, globulina ce fixează tiroxina şi o fracţiune transcortinică ce participă la transportul steroizilor.

α_2-*Globulinele* au şi ele mai multe componente: ceruloplasmina (30 mg/100 ml ser), ce conţine cupru; α_2-macroglobulina şi α_2-haptoglobulina (100—150 mg/100 ml ser) care fixează hemoglobina şi formează un complex cu greutate moleculară mare (circa 310 000) care nu trece prin filtrul renal, împiedicând astfel pierderea fierului; α_2-lipoproteine (LDL), transcobalamina, care fixează vitamina B_{12} şi transcortina care fixează cortizolul şi transportă corticoizii ş.a.

β-*Globulinele* formează o grupă unitară la electroforeza pe hârtie şi pot fi descompuse prin imunoelectroforeză în 2 fracţiuni: β_1 şi β_2, ultima inclusă în electroforeza pe hârtie în γ-globuline. Fracţiunea β_1 conţine în special β-lipoproteine care sunt tot LDL şi transferina (siderofilina) care fixează fierul şi-l transportă în organism. Concentraţia sa este de 300—400 mg/100 ml ser şi capacitatea ei de a fixa fierul este de circa 1,25 mg Fe pentru 1 mg transferină. Capacitatea sa totală de a fixa fierul este de 250—400 μg Fe/100 ml plasmă din care însă numai o treime (în jur de 120—130 μg/100 ml) este în mod normal saturată cu fier, diferenţa reprezentând capacitatea liberă a transferinei de a fixa fier. β_2-globulinele conţin β_2M şi β_2A-globuline. În fracţiunea β-globulinică se mai găsesc: properdina, hemopexina care fixează hemina şi fracţiunile C_3, C_4 şi C_5 ale complementului.

γ-*Globulinele* formează un grup unitar în electroforeza pe hârtie, dar prin imunoelectroforeză sunt separate în 3 fracţiuni: γG-globuline (IgG), γA-globuline (IgA) şi γM-globuline (IgM). γ-globulinele au un rol predominant în fenomenele de imunitate, ele constituind substratul proteic al multor anticorpi (vezi capitolul XII). Restul globulinelor au funcţii variate, participând la o mare diversitate de procese, ceea ce face din această clasă de proteine una din cele mai importante. În ceea ce priveşte presiunea lor osmotică, ea este destul de redusă, astfel că nu au un rol major în reglarea schimburilor apei şi electroliţilor dintre sânge şi ţesuturi. Tabelul 11.V înfăţişează constelaţia proteinelor plasmatice principale, obţinută prin electroforeză şi exprimată în cifre medii. Tabelul 11.VI prezintă grupul proteinelor plasmatice secundare, obţinute prin diverse metode, exprimate tot în cifre medii.

În afară de proteinele menţionate, plasma mai conţine un număr mare de proteine, cum sunt, de exemplu, enzimele. În stări patologice pot apărea în plasmă şi alte proteine (de exemplu crioglobuline, paraproteine ş.a.). O menţiune trebuie făcută pentru proteina C reactivă, care apare numai în condiţii patologice, în special în inflamaţii bacteriene şi abacteriene (şi în infarctul miocardic sau în procese neoplazice). Ea nu este un anticorp specific deoarece apare la câteva ore de la începutul unei inflamaţii, adesea înaintea unei accelerări a VSE şi a fost găsită şi în agamaglobulinemii. Numele i se datoreşte proprietăţii de a precipita cu polizaharide C somatice pneumococice.

Metode de fracţionare a proteinelor plasmatice. Separarea şi caracterizarea individualităţilor proteice din plasmă sunt de o importanţă considerabilă. Ele facilitează, pe de o parte, studiul naturii chimice şi funcţiei fiziologice a fiecărei proteine, iar pe de altă parte duc la posibilităţi de preparare şi purificare de fracţiuni pentru uz terapeutic.

Metodele pentru separarea fracţiunilor proteice sunt diferite, după cum se adresează unor proprietăţi de precipitare cu diferite săruri sau

TABELUL 11.V

Proteinele plasmatice principale
(electroforeză Tiselius — valori medii normale)

Denumirea	Greutate moleculară (d)	Mărime moleculară (Å)		Constantă de sedimentare (S)	Punct izoelectric (pH)	Cantitate (g/100 ml plasmă)	% din proteinele totale
		lungime	diametru				
Proteine totale						7,5	100
Albumine	69 000	150	38	4,6	4,9	4,3	57,3
Globuline					6,5	2,9	38,7
α-globuline						0,8	10,7
α_1-globuline	200 000	300	50	5		0,3	4
α_2-globuline	300 000			9		0,5	6,7
β-globuline	120 000	190	37	6,2		0,93	12,4
γ-globuline	156 000	235	44	7,2		1,16	15,5
IgG						0,84	11,2
IgA						0,22	3
IgM						0,1	1,35
Fibrinogen	400 000	700	38	9	5,3	0,3	4

unor proprietăți fizice: greutatea moleculară, migrare în câmp electric și adsorbția pe anumite substrate.

Precipitarea se poate realiza prin două tehnici deosebite: precipitarea salină și fracționarea cu alcool.

Precipitarea salină (Hammarsten) cu diverse săruri: amestec de fosfați de sodiu sau potasiu, clorură de sodiu, sulfat de magneziu și mai ales sulfatul de amoniu, este destul de arbitrară, iar valorile obținute nu concordă cu cele obținute prin alte metode. Această diversitate se datorește faptului că fiecare din aceste metode se adresează altei proprietăți fizice a proteinelor plasmatice, astfel că rezultatele îmbracă aspectul strict caracteristic.

Fracționarea cu alcool (Cohn) este singura care permite obținerea de numeroase subfracțiuni cu o puritate dintre cele mai mari. Ea necesită însă o aparatură costisitoare și de mare precizie, ceea ce îi reduce acce-

TABELUL 11.VI

Proteinele plasmatice secundare
(valori medii)

Nume şi sinonime	Abreviere	Constantă de sedimentare	Greutate moleculară (d)	Punct izoelectric (pH)	Nivel în plasmă mg/100 ml
1	2	3	4	5	6
Prealbumină bogată în triptofan (prealbumina ligant de tiroxină)	TrPA	4,2	61 000	4,7	31
α_1-Lipoproteină	α_1-Lp	5	195 000	5,2	244
α_1-Ac. glicoproteină (orosomucoid, α_1-seromucoid, α_0-globulină)	α_1 AGp	3,1	44 100	2,7	88
α_1-Antitripsină (α_1-glicoproteină)	α_1 ATr	3,4	45 000	4	355
Haptoglobină (α_2-seromucoid)	Hp	4,4	100 000	4,1	110
Ceruloplasmină	Cer	7,1	160 000	4,4	33
α_2-Macroglobulină	α_2M	19,6	820 000	5,4	300
α_2-Lipoproteină	α_2Lp	12	$12 \cdot 10^6$		190
α_2-Glicoproteină	α_2Gp	9	41 000	4,9	80
β_1-Lipoproteină	β_1Lp	7	$3,2 \cdot 10^6$	5,4	330
Transferina (siderofilina)	Tr	5,5	90 000	5,9	260
Hemopexina (citocromofilina)	Hpx	4,8	80 000		90
β_2-Glicoproteină	β_2Gp	2,9			22
α_2-Mucoproteină	α_2Mp	9		4,9	40
Crioglobuline	Cg			5,3	20

(Continuarea tabelului 11.VI)

1	2	3	4	5	6
Izoaglutinine	IA			6,3	2
Componentele complementului	$C_{1,2}$ ...				30
Properdina	Ppd	25			2

sibilitatea. Fracțiunile Cohn obținute sunt fie omogene, fie neomogene, reprezentând grupări de mai multe proteine. Fracțiunile Cohn nu au nici o corelație cu cele obținute electroforetic. Fracțiunea I conține: fibrinogenul, globulina antihemofilică (AHG) și proaccelerina. Fracțiunea II conține: γ-globulinele. Fracțiunea III conține: 1) lipoproteinele [fosfatide, carotenoizi, estrogenii (β)]; 2) izoaglutininele și proconvertina; 3) protrombina; 4) plasminogenul, unele componente ale complementului (C_1, C_3, C_4) și properdina. Fracțiunea IV conține: lipoproteine (colesterol, fosfataza) (α_1), α-globuline, colinesteraza, hipertensinogenul, mucoproteina acceleratoare de VSE, C_2, factorul antihemofilic B, globulina fixatoare de fier (β) și globulina bilirubinei (α_2). Fracțiunea V conține: albuminele și impurități de β- și γ-globuline. Fracțiunea VI conține: urme de albumine și globuline nedeterminabile, resturi de la precipitări (literele grecești arată în care din fracțiunile electroforetice se găsesc componenții respectivi ai fracțiunilor Cohn).

Metoda de fracționare cu alcool la temperatură joasă diferențiază, așadar, o serie de fracțiuni și subfracțiuni, dintre care unele, fiind foarte omogene și pure (I, II, V) pot realiza produse utilizabile în scop terapeutic și profilactic.

Ultracentrifugarea, preconizată de Svedberg, necesită o centrifugă de construcție specială, cu rotor tubular, de viteze mari, până la 200 000 de turații/minut. La viteze de ordinul 70 000—80 000, forța centrifugală depășește de câteva sute de ori gravitația și atunci particulele proteice se depun strict proporțional cu greutatea lor moleculară. Stratificarea diferitelor fracțiuni proteice ale serului sanguin se înregistrează optic cu ajutorul indicelui de refracție. Pe baza acestor date, granițele de separație a fracțiunilor proteice apar ca benzi groase, destul de net delimitate. Prin această metodă, care se adresează deci altei proprietăți fizice a proteinelor (greutate moleculară) decât metodei precipitării, se obțin patru fracțiuni: trei globulinice (α, β și γ) și una albuminică. Globulinele β și γ sunt dispuse în dreapta și stânga albuminelor și destul de aproape de ele; globulinele α sunt foarte îndepărtate (fig. XI.5).

Unitatea de măsură a vitezei de sedimentare, care nu depinde numai de greutatea moleculară, ci și de alți factori ca temperatura, viscozitatea, concentrația solventului, este *constanta de sedimentare S* (unitate Svedberg). Exprimate în S, în serul uman se identifică 4 componente: A=4,6 S (circa 77,9%), G=7 S (circa 13,9%), M=19—20 S (circa 2,6%) și componenta X (5,6%) care plutește variabil în raport cu solventul folosit și este

constituită din lipoproteine. Rezultatele obținute prin această metodă confirmă îndeaproape pe cele obținute prin electroforeză și, ca și acestea din urmă, nici ele nu prezintă identitate ca fracțiunile Cohn.

Electroforeza. Metoda preconizată de Tiselius se bazează pe principiul vitezei inegale de migrare anodică a diferitelor fracțiuni proteice, într-un câmp electric de intensitate și potențial constante și în anumite condiții

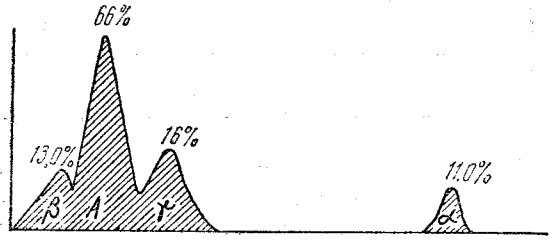


Fig. XI.5. — Proteinograma normală prin ultracentrifugare.

standard de mediu (temperatură, pH, timp etc.). Ea se adresează, deci, unei alte proprietăți fizice a proteinelor, spre deosebire de metodele studiate anterior. Plasma dializată în prealabil 48 de ore, este pusă într-un tub în formă de „U", de dimensiuni capilare, la capetele căruia se aplică o diferență de potențial calculată la 10 V/cm liniar (fig. XI.6). Proteinele migrează în acest câmp electric spre anod, cu o viteză variabilă, în funcție de încărcarea lor electrică, care la rândul ei este invers proporțională cu dimensiunile lor. Astfel, albuminele sunt cele mai rapide, urmează apoi α-, β- și γ-globulinele. La sfârșit, varietățile de proteine sunt înșiruite de-a lungul tubului, de la anod spre catod, în raport direct proporțional cu mobilitatea sau viteza lor de migrare. Pe baza înscrierii optice a undelor de interferență, ce se produc atunci când un fascicul luminos străbate straturi cu indici de refracție diferiți, granițele dintre fracțiunile proteice din tubul capilar apar fotografic ca benzi negre și se obține, astfel, o înșiruire de franjuri, care, transformată nomografic, dă repartiția la sută a diverselor fracțiuni proteice (fig. XI.7).

O metodă asemănătoare, dar mai simplă, este electroforeza pe hârtie, la care migrarea se realizează pe o hârtie de filtru specială, iar în loc de înscriere fotografică se obțin pete de difuziune. Acestea, developate, dau imagini colorate, iar eluate, permit dozarea fotometrică a fracțiunilor de proteine. Este o metodă rapidă pentru utilizare clinică; folosește serul sanguin. Fracțiunile electroforetice nu reprezintă individualități chimice; ele sunt o asociere de substanțe destul de variate, de natură proteică, al căror punct comun este că posedă aceeași viteză de migrație anodică. În sânul lor, pe bază de precipitări saline ulterioare, se pot separa subfracțiuni.

Metoda electroforetică, deși imperfectă, rămâne cel mai fidel procedeu de analiză a fracțiunilor de proteine din plasmă. Ea este utilă pentru clinică și pentru cercetarea purității fracțiunilor proteice obținute prin celelalte metode (în special precipitările saline și fracționarea prin alcool). Ea coincide cu ultracentrifugarea.

Cromatografia se bazează pe principiul adsorbției selective, descoperită de Țvet încă din 1906. Conform acestui principiu, într-un amestec de mai multe componente capabile să se adsoarbă, dacă viteza de adsorbție se

deosebește suficient de mult de la un component la altul, locul din coloana de adsorbant (unde fiecare component al amestecului este adsorbit total) va diferi și el, componentul cu cea mai mare viteză de adsorbție adsorbindu-se la începutul coloanei și componentul cu viteza cea mai mică adsorbindu-se la sfârșitul coloanei. În final, va avea loc o separare a amestecului adsorbit pe zone de câte un singur component.

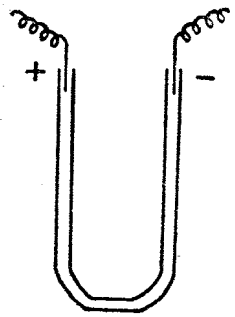


Fig. XI.6. — Tubul Tiselius pentru migrarea electroforetică.

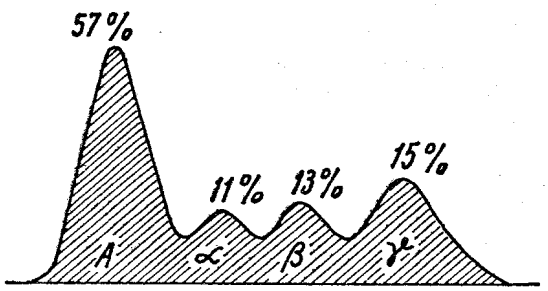


Fig. XI.7. — Electroforegrama tip Tiselius.

Celuloza modificată chimic servește cel mai adesea drept adsorbant; fracțiunile proteice adsorbite se dizolvă din nou cu ajutorul soluțiilor-tampon (eluare) și pot fi dozate individual. În principiu este vorba de o cromatografie prin schimbare de ioni, pentru că grupările introduse artificial în celuloză au sarcini electrice. Omogenitatea cromatografică servește și drept criteriu de puritate. Datele obținute prin cromatografie sunt destul de apropiate de cele obținute prin electroforeză.

Imunoelectroforeza este o altă metodă care permite punerea în evidență a unui mare număr de fracțiuni proteice în ser. Ea combină o tehnică fizicochimică (electroforeza) cu una imunologică (imunodifuzia): proteinele sunt întâi separate prin electroforeză în gel de agar, în agaroză sau pe acetat de celuloză și apoi sunt identificate ca imunoprecipitate specifice prin imunodifuzie după Ouchterlony.

Tehnica constă în punerea în contact și lăsarea lor să difuzeze unul către altul a proteinelor serice separate electroforetic (în cazul de față antigene serice) și a unui ser ce conține anticorpii corespunzători. În zona de atingere (zona de echivalență) a unui antigen proteic cu anticorpul său specific apare o linie (arc) de precipitat imun. Numărul arcurilor de precipitare depinde de valența (mono- sau polivalența) antiserurilor puse să reacționeze.

Pentru determinarea cantitativă a proteinelor plasmatice se folosesc diverse metode; dintre acestea, imunodifuzia radială (Mancini) a intrat în practica de rutină a laboratorului clinic.

Actualmente există și se folosesc, mai ales în cercetare, și alte metode imunoelectroforetice, ca, de exemplu, imunoelectroforeza încrucișată (bidimensională), imunoelectroforeza în rachetă (Laurell) etc.

Pentru o cercetare științifică de mare rigurozitate, însă, nici una dintre metodele descrise nu este suficientă singură, ci trebuie folosite mai

multe metode, deoarece datele lor nu se contrazic şi nu se exclud, ei se completează, dând astfel posibilitatea să se obţină asupra proteinelor plasmatice o investigaţie, pe cât de amplă, pe atât de precisă.

Originea proteinelor plasmatice a fost mult discutată şi a fost elucidată relativ recent. Experienţe folosind aminoacizi marcaţi au dus, în linii generale, la următoarele concluzii:

Albuminele sunt sintetizate de către ficat pe seama proteinelor alimentare. Nu toate proteinele au aceeaşi valoare albuminogenetică. Viteza de refacere a albuminelor, în condiţii de alimentaţie normală şi fără o boală supraadăugată, este de 0,3—0,5 g/kg corp/zi, ceea ce reprezintă un potenţial de regenerare a întregii cantităţi de albumină din plasmă în decurs de 6—7 zile.

Fibrinogenul este sintetizat tot de către ficat, în aceleaşi condiţii ca şi albuminele. Viteza sa de regenerare este superioară albuminelor, astfel că el poate fi refăcut total în circa 3 zile.

Globulinele au o origine controversată. Ele nu se produc în ficat, deoarece, contrar albuminelor, prezintă valori sanguine crescute în cazul leziunilor hepatice. În prezent se acceptă că originea lor este extrahepatică, şi anume, în sistemul limfocitar. Hiperglobulinemiile plasmocitoamelor au făcut să se susţină multă vreme că plasmocitul este celula formatoare de globuline. Ipoteza a căzut însă, deoarece există plasmocitoame fără hiperglobulinemie, reacţii plasmocitare după febre eruptive (rubeola) fără hiperglobulinemie, iar numărul acestor elemente este mult prea mic pentru a explica producţia destul de mare de globuline serice. Actualmente se admite că plasmocitul nu este singurul element care sintetizează globulinele, dar are şi rol de depozit, de transportor şi distribuitor de globuline. Locul de origine al globulinelor este limfocitul B. Numărul acestor elemente şi producerea lor continuă în organele limfoide poate acoperi cantitatea de globuline pusă în libertate. Eliberarea lor este reglată de un mecanism hormonul hipofizocorticosuprarenal, prin intermediul hormonilor ACTH şi glucocorticoizi. În ceea ce priveşte materialul folosit de sistemul limfocitar la sinteza globulinelor, el este tot de origine alimentară, dar pe bază de proteine de natură vegetală. Viteza lor de refacere este cea mai lentă dintre toate proteinele (10—14 zile).

Proprietăţile proteinelor plasmatice. Proteinele plasmatice posedă proprietăţile generale ale substanţelor coloidale. Ele se găsesc în plasmă legate între ele într-o structură submicroscopică de sol coloidal. În acest sol, fibrinogenul, având cea mai mare moleculă, şi o structură fibrilară, formează un fin reticul, dispersat în toate direcţiile şi extrem de flexibil, în ochiurile căruia se găsesc globulinele cu molecula elipsoidală şi albuminele cu molecula sferoidală, ca şi toţi componenţii neproteici ai plasmei. Apa plasmatică îmbibă acest sol şi, în funcţie de gradul de imbibiţie apoasă, legăturile sale sunt mai strânse sau mai laxe, având ca efect pentru plasmă o viscozitate mai mare sau mai mică.

Ori de câte ori în această structură intervin schimbări — care ţin de cantitatea şi calitatea proteinelor, de gradul de imbibiţie apoasă sau de echilibrul electrolitic al mediului de dispersie (pH) — starea de sol variază, legăturile se desfac şi se pot orienta după alte linii, iar în cazul cel mai grav, proteinele precipită trecând în stare de gel, fapt care trădează

tulburări profunde în plasmă, răsunet al unor grave perturbații în fiziologia întregului organism (fig. XI.8).

Molecula globulinică este mai mică decât a fibrinogenului și are sarcinile electrice necoincidente și asimetrice (moleculă polară). Aceasta îi conferă solubilitate redusă, dar și cele mai mari posibilități de asociere, atât între ele, cât și cu electroliți, lipide și polizaharide. Astfel, globuli-

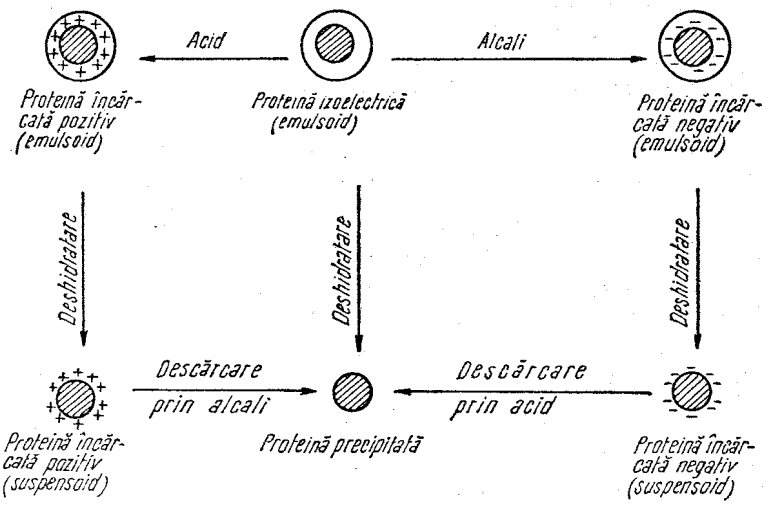


Fig. XI.8. — Stările electrice ale proteinelor plasmatice și modificările lor.

nele sunt legate cu colesterolul și fosfolipidele, formând lipoproteinele (β-globulinele sunt transportoarele de lipoizi ale organismului). De asemenea, se leagă cu polizaharidele, formând glicoproteinele (în fracțiunea α). Posedă o viscozitate destul de mare, dar mai mică decât a fibrinogenului.

Albumina are molecula cea mai mică, cu sarcini electrice simetrice (moleculă nepolară). Acest fapt îi conferă o mare solubilitate, dar, în schimb, îi reduce aproape la zero posibilitatea de combinație cu elementele din mediul dispers. Fiind aproape sferică, molecula de albumină se înconjură cu ușurință de un strat de apă adsorbit pe suprafața sa, ceea ce îi păstrează bine încărcarea electrică, îi menține perfect stabilitatea și îi micșorează viscozitatea (cea mai redusă dintre proteinele plasmatice). În structura proteică a plasmei se disting, deci, fibrinogenul, cu rol schelet, globulinele, cu potențialități nelimitate de a se uni cu alte sisteme moleculare prin legături laxe și albuminele, care mențin stabilitatea și viscozitatea plasmei în funcție de imbibiția lor apoasă.

Funcțiile proteinelor plasmatice. Proteinele plasmatice îndeplinesc următoarele funcții principale:

1) *Funcția nutritivă*, pusă în evidență de Whipple, care a arătat, pe baza investigării bilanțului azotat la animalele înfometate, că necesitățile în proteine ale organismului pot fi supleate prin injecții intravenoase de proteine plasmatice, din care țesuturile și organele își iau cvantumul necesar de proteine în scop de nutriție fără ca metabolismul lor să

sufere (balanța de N normală). Se poate afirma (Sturgis) că albuminele serice reflectă schimburile nutriției proteice ale întregului organism.

2) *Funcția plastică* corespunde sintezei proteinelor celulare, caracteristice fiecărui țesut în parte, după remanierea moleculară specifică, care se petrece în sânul țesutului respectiv.

3) *Menținerea volumului sângelui.* Albuminele plasmatice, asigurând menținerea în circulație a unei mari cantități de apă, reglează implicit raportul globule/plasmă (hematocritul) și acest fapt se repercutează asupra întregului volum sanguin.

4) *Menținerea tensiunii arteriale.* Fracțiunea albuminică, reținând apa, permite o bună umplere volumetrică a patului vascular, condiție a menținerii tensiunii arteriale. Hipertensinogenul, o α_2-globulină, precursor al hipertensinei, are rol important în menținerea tensiunii.

5) *Mobilitatea eritrocitelor.* Diverse studii au arătat că eritrocitele se mișcă mult mai greu și au un coeficient de frecare de pereții vaselor mult mai mare, dacă în mediul respectiv lipsesc proteinele. Ca atare, proteinele plasmatice cruță eritrocitele de o uzură funcțională prea rapidă.

6) *Stabilitatea suspensiei eritrocitelor în plasmă.* Prin proprietățile fizicochimice diferite, legate de constituția lor moleculară, albuminele tind să protejeze stabilitatea suspensiei eritrocitelor, în timp ce globulinele (mai ales haptoglobina, o α_2-globulină) și fibrinogenul au efect contrar. Orice modificări în raportul albumine/globuline provoacă perturbări în stabilitatea în plasmă a eritrocitelor, cu tendință la agregare, fapt care se traduce clinic printr-o VSE crescută.

7) *Vehicul al diferitelor substanțe în sânge.* Albuminele au o funcție pexică mare; ele fixează și transportă: ioni (calciu, cupru, clor, zinc, mercur), bilirubină, hem, acid uric, vitamină C, medicamente (digitoxină, penicilină, sulfamide etc.) și coloranți (roșu de Congo) (calciul ionizat și cel fixat de albumine se găsesc în echilibru astfel că într-o hipoalbuminemie poate apărea o hipocalcemie). Globulinele, la rândul lor, fixează și transportă fier și cupru; în anumite condiții patologice (icter) pot să fixeze și bilirubina.

8) *Enzime și hormoni.* De fracțiunile globulinice α și β se leagă o serie de biocatalizatori ai serului ca: fosfataza alcalină, peptidaza, colinesteraza, lipaza și fibrinolizina. De asemenea, tot în această fracțiune se găsesc: hormonul tireotrop hipofizar, estrogenii și carotenoizii.

9) *Homeostazia hemostazei.* Proteinele plasmatice pun la dispoziție factorii plasmatici ai coagulării și fibrinolizei* cu rol în procesul complex al echilibrului fluidocoagulant sanguin (vezi Capitolul XIV).

10) *Balanța hidroosmotică a sângelui.* Rolul important jucat de proteinele plasmatice în reglarea balanței apei dintre sânge și țesuturi a fost arătat anterior (apa și electroliții). În virtutea proprietăților lor coloidale, proteinele nu difuzează prin membrana capilară și exercită astfel presiunea lor oncotică, care, prin jocul de alternanță cu presiunea hidrostatică, permite un continuu și masiv transport de apă din sânge spre țesut,

* Factorii Hageman, Rosenthal, Fletcher, Fitzgerald, antihemofilici B și A, proconvertina, Stuart-Power, proaccelerina, protrombina, fibrinogenul, von Willebrand, antitrombinele II și III, proteinele C și S, factorul stabilizant al fibrinei, plasminogenul, antiplasminele etc.

la nivelul capilarelor arteriale, și de la țesut spre sânge la nivelul capilarelor venoase. Datorită acestui continuu flux și reflux fiziologic este posibilă hrănirea țesuturilor cu substanțele introduse prin alimentație și debarasarea lor de substanțele rezultate din catabolismul lor. Tot pe această linie se situează și reglarea raportului globule/plasmă, care ține de gradul mai mare sau mai mic al hidratării sângelui și care, la rândul său, depinde tot de imbibiția apoasă a proteinelor plasmatice. Dintre proteinele plasmatice, albumina este cea care exercită cea mai mare presiune oncotică, deoarece are molecula aproape sferică și absoarbe cel mai perfect apa (1 g albumină reține 18 ml apă). Albuminele sunt responsabile de 80% din presiunea oncotică a plasmei, având o forță oncotică dublă față de globuline. Din punct de vedere oncotic, 8 g albumine singure sunt aproape echivalente cu 10 g de proteine plasmatice. Acest fapt explică eficacitatea soluțiilor de albumine concentrate administrate bolnavilor în stare de șoc.

11) *Echilibrul acidobazic al sângelui.* Deoarece pH-ul sanguin este 7,35, proteinele plasmatice se află în zona alcalină a punctului lor izoelectric și, ca atare, se vor disocia ca acizi slabi, dând săruri alcaline (PrNa). Sistemul tampon PrH/PrNa contribuie la menținerea constantă a echilibrului acidobazic al sângelui și, deci, la stabilitatea pH-ului său.

12) *Funcția imunologică.* Proteinele plasmatice participă masiv la imunitatea organismului; ele asigură prin cele 5 clase de imunoglobuline care constituie substratul anticorpilor aproape 90% din efectorii imunității umorale. Aceasta se realizează datorită imunoglobulinelor care sunt extrem de heterogene și au o gamă variată de specificități.

Echilibrul proteic. Proteinele au un metabolism propriu, în care fenomenele de dezintegrare și consum alternează cu cele de resinteză și aport. Astfel, aminoacizii din proteinele alimentare capătă diferite destinații. Unii rămân ca atare înmagazinați în ficat, pentru a asigura menținerea constantă a nivelului lor în sânge, alții sunt catabolizați prin degradări succesive în scopuri energetice (iar azotul lor apare în urină) și, în fine, alții sunt întrebuințați la sinteza proteinelor plasmatice și celulare. Cercetări cu izotopi radioactivi au arătat că nu numai proteinele alimentare urmează aceste căi, ci și cele endogene. Dintre toate proteinele, cele plasmatice se consumă și se înlocuiesc cel mai rapid (5—7 zile).

Toate aceste fapte trădează existența unui mecanism de reglare a proteinemiei, asemănător cu cel întâlnit la alți constituenți vitali ai organismului. Se poate vorbi deci și de o homeostazie proteică, asemănătoare cu cele ionică, hidrică, glucidică etc. În cadrul acesteia, trebuie să se accepte și prezența unor rezerve proteice preformate labile, gata să fie puse la dispoziția plasmei oricând, pentru a suplini anumite pierderi de moment, fără ca funcțiile vitale exercitate de proteinele plasmatice să sufere și să se perturbe astfel homeostazia proteică. Aceste rezerve se găsesc în mare parte în ficat, în țesutul limfoid și într-o măsură mai mică în mușchi. Există continuu un echilibru dinamic, astfel încât scăderea proteinelor plasmatice provoacă imediat aport din țesuturile unde se găsesc rezervele, iar nevoia de proteine în sectorul celular are ca efect aportul plasmatic. Proteinele plasmatice sunt singurele care pot deveni proteine celulare, fără remaniere intermediară și dezintegrare până la stadiul de aminoacizi (Yule).

Factorii care controlează echilibrul proteic al plasmei sunt încă puțin cunoscuți.

În privința realizării echilibrului fracțiunilor proteice între ele, există un mecanism, care se limitează numai la compensație: când scade fracțiunea albuminică, crește cea globulinică și invers; această balanță tinde să înlocuiască o fracțiune prin alta, capacitatea funcțională a plasmei rămânând neschimbată.

Ori de câte ori echilibrul proteic al plasmei nu se mai poate adapta condițiilor create de diferite stări morbide și mecanismele sale reglatoare nu mai pot face față perturbărilor patologice, fie datorită prelungirii lor în timp, fie datorită depășirii anumitor limite de intensitate, apar sindroame proteice, unele prin insuficiență proteică (hipoproteinemie, disproteinemie, tulburări ale echilibrului fracțiunilor proteice între ele), altele prin paraproteinemie (apariția de proteine străine în circulație).

SUBSTANȚE DIVERSE

Acest grup cuprinde substanțe diverse — ca vitamine, hormoni, enzime etc. — care nu au în molecula lor substrat proteic sau lipoproteic și care se găsesc în fracțiunea a VI-a Cohn, rămasă după precipitarea a tot ce a fost proteină în primele cinci fracțiuni. Tabelele 11.VII și 11.VIII prezintă cele mai importante din aceste substanțe.

TABELUL 11.VII

Unele enzime în plasmă

Tipul enzimei	Valori normale (la 100 ml)
Esteraze	
lipaze	1,5 U.I.
fosfataza alcalină	1,4 U. Bodansky 8—13 U. King 35—90 U.I.
fosfataza acidă	0,2—0,8 U. Bodansky 1—4 U. K-Armstrong
colinesteraza	7—10 U.I.
Enzime ale metabolismului hidrocarbonat	
α-amilaza	32 U. Wohlgemuth 60—180 U. Somogyi
aldolaza	5—7 U.I.
Transaminaze	
Glutam oxalacetică	10—30 U.I.
Glutam piruvică	6—35 U.I.
Alte enzime	
Glutation-reductaza	0,15—0,6 μM substr. modificat/ml ser/oră la 25°C
Pepsinogen	600—2 200 U.I.
CPT	36—188 U.I.
LDH-L	109—193 U.I.
HBDH	193—343 U.I.
γGT	♂=11—63 U.I. ♀=8—35 U.I.

TABELUL 11.VIII

Vitaminele în plasmă
(valori la 100 ml)

A	100—200 μg
B_1	2—16 μg
B_2	35—45 μg
B_5	6—22 μg
C	0,6—1,5 mg
E	1,1 mg
H	1—1,5 μg
PP	10—18 μg
B_6	7 μg
B_{12}	0,07—0,12 μg
D	65—165 U

BIBLIOGRAFIE

1. AUDUBERT R., de MENDE S.: The principles of Electrophoresis. Edit. Hutchinson, Londra, 1959.
2. AUGENER W.: Protides of the biological fluids. Edit. Elsevier, Amsterdam, 1965.
3. BANG N. U., BELLER F. K., DEUTSCH E., MAMMEN F. E.: Thrombosis and bleeding disorders, Academic Press, New York, 1971.
4. COHN C., WOLFSON W. C.: J. Lab. Clin. Med. 1948; 33: 367.
5. EDSALL J. T.: Actualités Biochim. 1958; 20: 118.
6. GRABAR P., de VAUX, CYR CH., CLEVE H.: Bull. Soc. Chim. Biol. 1960; 42: 853.
7. KUNKEL H. G.: The plasma proteins. Academic Press, New York, 1963.
8. NILSSON I. M.: Haemorrhagic and Thrombosis diseases. Edit. J. Willey, New York, 1974.
9. ONKLEY J. L.: The lipoproteins. Edit. Karger, Basel, 1958.
10. POPPA C., ENACHE F.: Med. Int. 1984; 1: 41.
11. PUTNAM F. W., EASLEY C. W., LYNN L. T.: Biochim. Biophys. Acta 1962; 58: 279.
12. PUTNAM F. W.: The plasma proteins, Academic Press, New York, 1975.
13. SCHERAGA H. A.: Protein structure, Academic Press, New York, 1961.
14. SVEDBERG T., PEDERSEN K. O.: Die Ultrazentrifuge, Edit. Steinkopf, Dresda, 1940.
15. SVENSSON H., KALMET F.: Science Tools 1959; 6: 13.
16. TANFORD C.: J. Am. Chem. Soc. 1959; 72: 441.
17. TISELIUS A. S., HJERTEN S., LEVIN O.: Arch. Biochem. 1956; 65: 132.
18. WILLIAMS W. J., BEUTLER E., ERSLEY A. J., LICHTMAN M. A.: Hematology, McGraw Hill Publ., New York, 1990.
19. WUHRMANN F., MÄRKI H. H.: Dysproteinämien und Paraproteinämien, Edit. Schwabe, Basel, 1963.
20. WUHRMANN F., WUNDERLY C.: Die Bluteiweisskörper des Menschen, Edit. Schwabe, Basel, 1957.
21. * * *: Abstracts of the 6-th meeting of ISH Euro-Afro Division, Atena, 1981.

XII

IMUNOGLOBULINELE

ILEANA FUNDUC

Imunoglobulinele sunt globuline serice cu structură glicoproteică sintetizate de plasmocite. Ele posedă o activitate biologică de anticorp, combinându-se specific *in vivo* și *in vitro* cu substanțele antigenice care le-au indus formarea. Ele reprezintă aproximativ 20% din totalul proteinelor plasmatice și au, de regulă, o mobilitate electroforetică similară fracțiunii γ-globulinelor, mai rar a fracțiunilor β și α.

STRUCTURA GENERALĂ

Imunoglobulinele (Ig) sunt constituite din proteine policatenare rezultate din combinarea, după Edelman (5), a două tipuri de lanțuri polipeptidice cu greutate moleculară diferită: lanțul greu (H) cu greutate moleculară mare (50 000) care conține în jur de 450 resturi de aminoacizi și lanțul ușor (L) cu greutate moleculară aproape jumătate (23 000) și cu aproximativ 220 resturi de aminoacizi (16).

Structura lor implică o unitate de bază tetracatenară postulată de către Porter (14, 15) (fig. XII.1) constituită dintr-un număr egal de lanțuri H și L [formula generală $(H_2L_2)n$] legate între ele prin punți covalente disulfidice și forțe necovalente (legături de hidrogen). În ceea ce privește secvența aminoacizilor, lanțurile H și L prezintă două regiuni: una variabilă (V) conținând porțiunea amino-terminală și una constantă (C) porțiunea carboxi-terminală.

Dualitatea particulară a structurii moleculei de imunoglobulină reflectată prin prezența a două regiuni diferite implică existența a două gene destinate sintezei fiecărui lanț, cât și a unei evidențe structurale privind bifuncționalitatea moleculei care, pe de o parte, recunoaște și se leagă specific cu antigenul și, pe de altă parte, efectuează o varietate de procese (2).

Lanțul ușor L este de două tipuri: K (kappa) și λ (lambda), primul predominând ca proporție (65%), raportul K/λ fiind 6/4. O moleculă de Ig conține numai unul din aceste tipuri, niciodată amândouă. Cele două tipuri de lanț ușor se pot, însă, asocia cu orice clasă de lanț greu. Pentru lanțurile λ au fost descrise patru subtipuri.

Lanțul H este format dintr-un domeniu variabil V_H și trei domenii constante — C_H1, C_H2 și C_H3, iar lanțul L dintr-un domeniu variabil V_L și unul constant C_L.

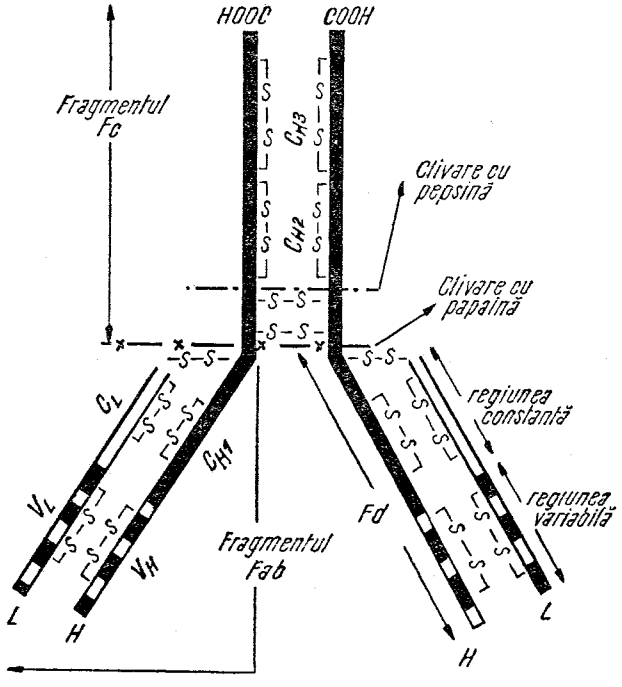


Fig. XII.1. — Structura tetralanț a IgG_1 umană (22).

In vecinătatea legăturii disulfidice care unește lanțurile H, între domeniile C_H1 și C_H2 se află regiunea „balama". Ea este formată din 20—100 resturi de aminoacizi conținând mai ales prolină și cisteină (6) care favorizează structura flexibilă a moleculei de Ig în formă de Y (1) și se datorează susceptibilității sale față de proteoliza enzimatică și abilității de a lega una sau două particule (bacterie, virus). Papaina acționează la nivelul regiunii „balama" și scindează molecula IgG din zona amino-terminală a legăturii disulfidice interlanț, în fragmentul Fab (fragment fixator de antigen) care include domeniile variabile ale ambelor lanțuri (V_L și V_H), domeniile constante ale lanțurilor L și parțial H (C_H1, C_L) și fragmentul Fc (fragment cristalizabil), format din jumătățile carboxi-terminale ale lanțurilor H (fig. XII.2).

Digestia cu pepsină duce la formarea unui fragment mai mare $F(ab')_2$ care conține două unități Fab și regiunea balama cu legăturile

disulfidice interlanţ H intacte şi mai multe peptide din fragmentul Fc, printre care F'c, corespunzător jumătăţii carboxi-terminale (C_H3).

Fragmentul Fab se poate scinda la rândul său în porţiuni ce cuprind domeniile variabile V_L şi V_H (fragmentul F_V) şi cele constante C_L şi C_H1. Porţiunea lanţului H prezentă în fragmentul Fab (V_H+C_H1) constituie fragmentul Fd.

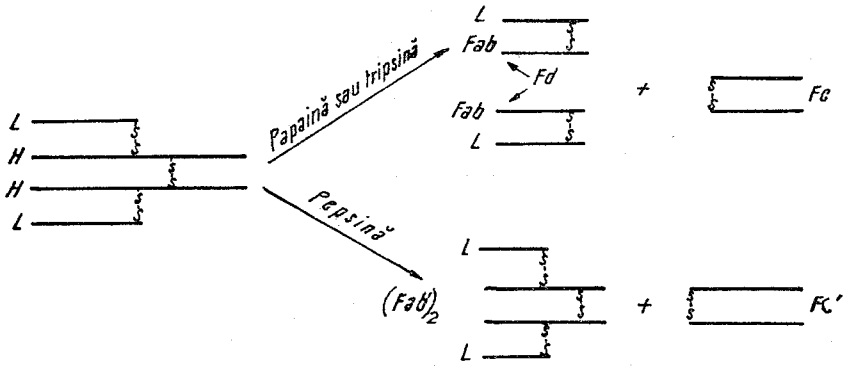


Fig. XII.2. — Fragmentele obţinute prin clivarea enzimatică a moleculei de imunoglobulină (7).

Prin acţiunea plasminei se obţine fragmentul Facb căruia îi lipsesc domeniile C_H3 ale celor două lanţuri H.

Legăturile disulfidice (—S—S—) sunt situate între lanţuri (între H şi H, între H şi L, între L şi L) şi sunt importante pentru structura tridimensională a Ig. Pe lângă lanţurile H şi L mai există şi un lanţ J prezent în Ig polimerice. Acesta este constituit din mai multe unităţi monomerice (IgA dimer sau trimer, IgM pentamer). Lanţul J este constituit dintr-un lanţ glicopeptidic mic (15 000 d), care conţine mult arginină, acid aspartic şi acid glutamic şi are proprietăţi acide. Lanţul J constituie sub 5% din totalul proteinelor polimer şi conţine o enzimă care catalizează reacţia de schimb disulfidic ($—S—S— \rightleftarrows 2SH^-$). Nu se ştie încă dacă acest lanţ este indispensabil pentru polimerizarea unităţilor monomerice din IgA şi IgM, dar se admite că prezenţa sa uşurează polimerizarea.

HETEROGENITATEA IMUNOGLOBULINELOR

Imunoglobulinele — familie de proteine cu o arhitectură moleculară de bază similară — sunt extrem de heterogene atât ca specificitate de legare cu antigenul şi activitate biologică, cât şi ca variabilitate structurală, datorită secvenţelor aminoacizilor din lanţurile polipeptidice.

Heterogenitatea Ig este, pe de o parte, independentă de proprietatea de anticorp privind variaţiile structurale definite ca variante izo-

tipice și alotipice și, pe de altă parte, dependentă de proprietatea de anticorp din punct de vedere al variațiilor structurale definite ca variante idiotipice.

Variantele izotipice se datoresc unor grupuri caracteristice (determinanți antigenici) localizate în special în regiunile constante prezente la indivizii unei specii date (clase, subclase, tipuri, subtipuri). Ele reprezintă diferențele antigenice care caracterizează clasa și subclasa de lanț H și tipul și subtipul de lanț L.

Structura tetralanț este identică tuturor claselor de Ig și dacă lanțurile ușoare sunt similare în fiecare caz, lanțurile grele sunt specifice fiecărei clase. În funcție de tipul lanțurilor grele în număr de cinci (γ, α, μ, δ și ε) la om, Ig se împart în cinci clase (sau izotipuri), și anume: IgG, IgA, IgM, IgD și IgE corespunzătoare lanțurilor γ, α, μ, δ și ε. IgG, IgA și IgM prezintă și subclase: 4 subclase pentru lanțul γ (γ_1—γ_4), două pentru lanțul α (α_1 și α_2) și două pentru lanțul μ (μ_1 și μ_2). Regiunea variabilă ocupă aproximativ 1/4 din lanț, restul fiind delimitat prin punți disulfidice în trei domenii (C_H1, C_H2, C_H3) pentru lanțurile γ, α δ sau în patru (C_H1, C_H2, C_H3, C_H4) pentru lanțurile μ și ε.

Variantele alotipice se datoresc unor variații în secvența de aminoacizi din lanțurile H și L, mai ales în regiunea constantă. Ele sunt determinate genetic și neproprii tuturor indivizilor dintr-o specie. Aceste variante sunt produsele genelor allelice (forme alternative ale unei gene la un singur locus) moștenite într-o modalitate mendeliană simplă. Deși toți indivizii normali ai unei specii au toate clasele de imunoglobuline, fiecare individ are numai o formă a fiecăruia din alotipii imunoglobulinelor lor. Pentru Ig umane s-au descris markeri alotipici situați pe lanțurile grele ale celor patru subclase de IgG (factorii Gm în număr de 25), pe lanțurile α_2 ale subclasei IgA_2 (factorii A_{2m} în număr de 2) și pe lanțurile ușoare de tip K (factorii Inv în număr de trei) și λ [Oz(+) sau (—)].

Variantele idiotipice constituie o altă categorie de determinanți antigenici, care deosebesc un domeniu V de celelalte domenii V. Domeniul V nu prezintă variabilitate uniformă în toată lungimea sa. Anumite poziții de aminoacizi arată grade excepționale de variabilitate, denumite zone „hipervariabile" sau regiuni „determinatoare de complementaritate"; prezente în domeniile V_H, V_K și V_λ (3 în lanțul L și 4 în lanțul H) (fig. XII.3), ele sunt implicate direct în formarea situsurilor de combinare ale anticorpilor care intră în contact cu antigenul. Adiacent acestor zone există regiuni de variabilitate redusă, rigide, contrastante ca proprietăți față de primele.

Specificitatea idiotipică este specificitatea antigenică individuală unică a une populații de anticorpi (13). Specificitatea idiotipică este particulară unui singur individ (9). Determinanții idiotipici, care sunt identificați prin abilitatea de a crea anticorpi contra lor, sunt localizați în general în regiunile „hipervariabile" ale lanțurilor grele și ușoare sau în zone adiacente acestora, această localizare nefiind, însă, exclusivă.

Heterogenitatea Ig se mai datorează și posibilității mutațiilor (24), care duce la capacitatea celulelor formatoare de IgG de a sintetiza fiecare Ig specifică. O genă stabilă codifică sinteza părții constante a Ig la toate

celulele; o genă multiplă V codifică partea variabilă a lanțului peptidic. Acesta poate suferi mutații în timpul vieții unui individ sau în cursul evoluției sau selecției adaptive a mutanților, ajungându-se astfel la celule care sintetizează lanțuri cu V_L și V_H diferite.

Extrema varietate a specificităților antigenice și a activităților biologice ale Ig, expresie a diferențelor structurale determinate de sec-

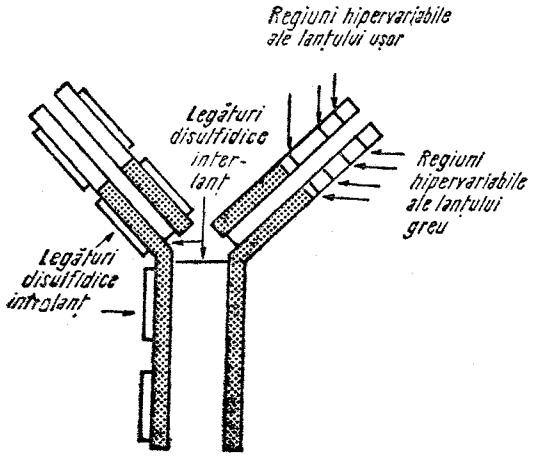


Fig. XII.3. — Reprezentarea schematică a moleculei de IgG ilustrând pozițiile regiunilor hipervariabile presupuse ca existente în lanțurile grele și ușoare (11).

vențele deosebite ale aminoacizilor în lanțurile polipeptidice, până nu de mult imposibil de analizat, începe să fie cunoscută grație posibilităților de studiu a secvențelor de aminoacizi din moleculele de Ig cu ajutorul anticorpilor monoclonali.

Situsul de combinare cu antigenul. Regiunile „hipervariabile" din lanțurile H și L determină, prin resturile de aminoacizi ce le conțin, specificitatea situsurilor de combinare care fixează antigenele. Situsul de combinare rezultă din interacțiunea ambelor tipuri de lanțuri H și L, ipoteză verificată prin tehnica de marcare prin afinitate (20).

Valența anticorpilor indică numărul de situsuri de combinare existente în moleculă, care nu sunt împiedicate steric să-și manifeste activitatea.

Afinitatea anticorpilor exprimă forța de interacțiune dintre antigenul și anticorpul corespunzător. *Afinitatea intrinsecă* reprezintă afinitatea unui singur situs de combinare, spre deosebire de *afinitatea funcțională* denumită și *aviditate* care cuprinde toate situsurile de combinare active funcțional.

ROLUL BIOLOGIC AL DOMENIILOR IMUNOGLOBULINELOR

Structura diverselor domenii ale Ig este intim corelată cu bifuncționalitatea lor. Astfel, domeniile variabile V_L și V_H formează împreună situsul de combinare al anticorpilor, fiind incluse în funcțiile efectoare sau de recunoaștere anticorpică, în timp ce domeniile constante (în

special cele din regiunea Fc) mediază funcţiile biologice efectoare ca, de exemplu, legătura cu complementul (domeniul C_H2), cu macrofagul (domeniul C_H3), controlul vitezei de turnover, transferul placentar, activitatea reaginică etc.

Studii cu raze X au arătat că lanţurile polipeptidice ale domeniilor se înfăşoară într-o modalitate caracteristică. Structura α-helicoidală nu este virtuală pentru Ig, trăsătura predominantă constând din prezenţa unor benzi antiparalele β-pliate, stabilizate prin legături disulfidice intralanţ şi prin legături de hidrogen.

Toate domeniile (exceptând C_H2) sunt distribuite în perechi care sunt legate între ele prin forţe necovalente. Domeniul C_H2 nu prezintă interacţii laterale, iar glucidele care se leagă de acest domeniu au, probabil, rolul de a-l stabiliza.

Domeniul C_H2 controlează catabolizarea Ig, deci conţine situsul acestui control. Transmisia transplacentară sau intestinală a moleculei de IgG pare, de asemenea, controlată de acelaşi domeniu.

Se presupune că IgG s-ar lega de limfocite prin intermediul regiunii Fc.

Factorii reumatoizi sunt anticorpi care reacţionează cu determinanţii antigenici ai IgG umane localizaţi în domeniile C_H2 şi C_H3.

Citofilia necesită cooperarea cu $C\gamma2$, cu toate că era considerată o proprietate a domeniului $C\gamma3$.

În formularea noţiunii de „domeniu" (5) s-a propus ca fiecare entitate de acest tip să se dezvolte pentru a efectua una sau mai multe funcţii specifice. Deşi o serie de proprietăţi biologice ale Ig nu s-au atribuit încă unui anumit domeniu, a devenit evident că, conceptul domeniilor din punct de vedere structuralo-funcţional este în prezent unul din principiile de bază ale biologiei Ig. De altfel, rezolvarea analizei structurii Ig înseamnă posibilitatea de a răspunde la problemele cheie pe care acestea le implică, şi anume natura relaţiilor structură-funcţie cuprinsă în dualitatea lor funcţională, pe de o parte, şi modul de organizare al informaţiei necesare exprimării acestor funcţii, pe de altă parte.

STRUCTURA ŞI ACTIVITĂŢILE BIOLOGICE ALE CLASELOR DE IMUNOGLOBULINE

Imunoglobulina G (IgG) are greutatea moleculară de aproximativ 150 000 d, reprezintă 70—75% din totalul Ig serice la om şi este repartizată aproape egal între compartimentele intra- şi extravasculare. Cele 4 subclase (fig. XII.4), IgG_1 (70%), IgG_2 (20%), IgG_3 (8%), IgG_4 (2%), se deosebesc între ele prin structura regiunilor C_H şi prin numărul şi poziţia legăturilor disulfidice interlanţ. Numărul legăturilor ce unesc lanţurile grele sunt două pentru IgG_1 şi IgG_4, patru pentru IgG_2 şi 10—13 pentru IgG_3, regiunea balama fiind de 4 ori mai lungă decât a celorlalte clase, ceea ce duce şi la o greutate moleculară crescută. Extinderea regiunii balama la IgG_3 este legată de eficienţa acestei subclase asupra activării căii clasice a complementului (clq legat de regiunea C_H2). De altfel, IgG_3 prezintă şi o stare deosebită de agregare depen-

dentă de concentrația implicată probabil în activarea complementului prin reactivitatea sa pentru clq. Din contră, absența activării complementului la IgG_4 rezultă din configurația sterică care apare prin legarea componentei clq de regiunea $C\gamma_4 2$. Mai mult, există diferențe de susceptibilitate a subclaselor la papaină (IgG_3 fiind cea mai susceptibilă), care se pot explica de asemenea prin structura regiunii balama.

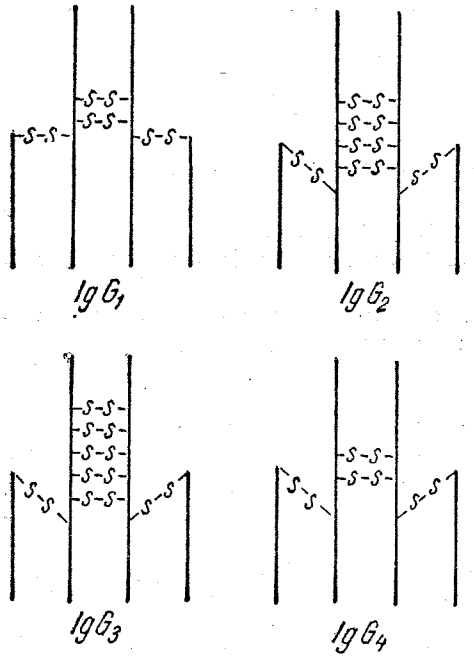


Fig. XII.4. — Dispunerea legăturilor disulfidice în subclasele de IgG umană (19).

În lanțul γ există două oligozaharide, una de dimensiuni mai mari, prezentă în regiunea Fc, iar cealaltă, mai mică, atașată de regiunea balama.

Macrofagele au pe membrana lor receptori ce fixează IgG_1 și IgG_3 și fragmentul lor Fc. Domeniul C_H3 din aceste două subclase răspunde de fixarea lor pe macrofage, care capătă astfel posibilitatea de a ingera și distruge celule, particule sau complexe antigen-anticorp cu IgG pe suprafața lor.

La subclasele IgG_2 și IgG_4 apar selectiv anumiți anticorpi cu polizaharide sau cu globulină antihemofilică.

Fixarea IgG de pielea heterologă se obține cu toate subclasele sale cu excepția IgG_2.

Anticorpii IgG apar în special în timpul răspunsului imun secundar și pot exercita o acțiune de inhibare asupra sintezei anticorpilor IgM. Difuzând ușor în spațiile extravasculare, IgG are rolul de a neutraliza toxinele bacteriene și de a se lega de microorganisme pentru a ușura fagocitarea lor.

IgG_3 are o rată catabolică rapidă (rata la care este catabolizat în sex) cu un timp de înjumătățire de o săptămână; celelalte clase au un timp de înjumătățire de trei săptămâni (10).

IgG este singura clasă de Ig ce poate traversa placenta. Toate subclasele IgG sunt transferabile placentar de la mamă la făt, nu însă în mod egal (IgG_2 este cea mai greu transferabilă); ele sunt responsabile pentru apărarea majoră imună umorală a nou-născuților în primele luni de viață, înaintea dezvoltării anticorpilor proprii.

Imunoglobulina A (IgA) reprezintă 15—20% din Ig serice, are o greutate moleculară analogă IgG, este anticorpul principal în cele mai multe secreții externe și este Ig produsă preponderent în glande și membrane mucoase. Ea apare structurată în două subclase (IgA_1 și IgA_2), prima existând predominant (80—90%) și sub formă de monomer (7S) în pro-

porție de 80% și de polimeri (10S predominant, 13S, 15S), polimerizarea fiind mediată de lanțul J (fig. XII.5).

Regiunea balama este dublă în IgA_1 și IgA_2, ultima existând în două forme alotipice: A_{2m} (1) și A_{2m} (2). După cum se vede și în tabelul 12.I, alotipului A_{2m} (1) îi lipsesc legăturile disulfidice care leagă lanțurile α cu lanțurile ușoare. Această moleculă este stabilizată, probabil prin legăturile necovalente existente între lanțurile grele și ușoare.

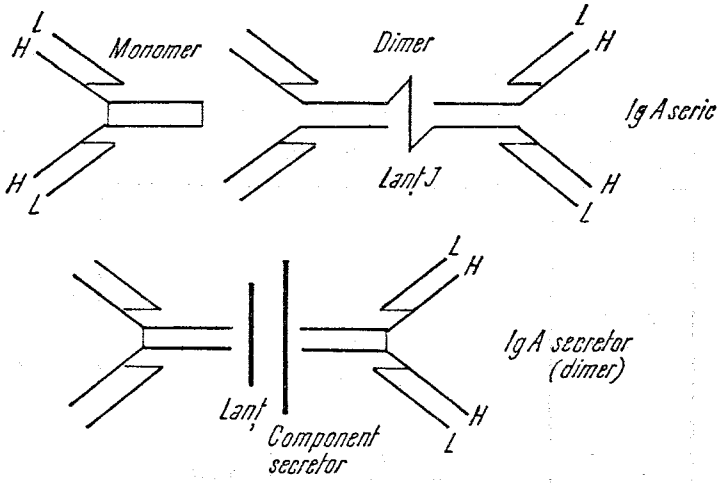


Fig. XII.5. — Reprezentarea schematică a structurii IgA umană (11).

Structurile particulare ale regiunii balama și ale domeniului C_H2 ale subclaselor IgA explică imposibilitatea fixării clasice a complementului și rezistența IgA_1 la enzimele intestinale și a IgA_2 la proteazele bacteriene.

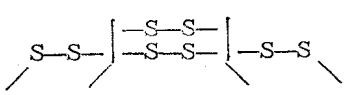
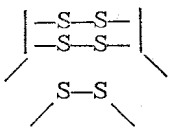
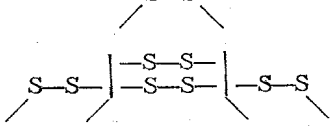
Când IgA se găsește în secreții externe (salivă, lacrimi, secreții bronșice, intestinale și vaginale, lichidul prostatic, colostru), unde asigură cea mai importantă funcție, și anume imunitatea locală față de microorganisme (spre deosebire de sistemul imunologic umoral care asigură imunitatea sistemică) și se află în raportul IgG/IgA<1, este numită IgA secretor (greutate moleculară 400 000 d). Sub această formă ea apare ca dimer stabilizat prin lanțul J și prin componenta secretorie (CS). Aceasta este o glicopeptidă cu greutate moleculară de 70 000 d, bogată în glucide (18%), sintetizată de celulele epiteliale. Compoziția CS în aminoacizi este deosebită de toate celelalte lanțuri polipeptidice din Ig. Fiind legată de regiunea Fc a IgA prin legături disulfidice și legături de hidrogen, are o structură stabilă, rezistentă la acțiunea enzimelor proteolitice care îi ușurează secreția de la un spațiu extracelular la altul. În deficiențele de IgA, aceasta este înlocuită cu IgM care are de asemenea capacitatea să lege CS. Colostrul este sursa cea mai bogată de IgA secretor. Mecanismul de transfer al imunității materne al IgA secretor din colostru este deosebit, deoarece IgA seric nu trece prin bariera placentară. CS poate exista în secreții și sub formă liberă.

Se discută încă, dacă funcţia IgAs este de a distruge antigenii sau de a le bara accesul în sistemul imun general. În secreţiile interne (lichid sinovial, amniotic, pleural, cerebrospinal) raportul IgG/IgA este 5/1, analog cu cel din ser, iar IgA nu este de tip secretor, ci de tip seric. IgA şi componenta secretorie au fost decelate şi în hepatocitelele periportale.

Imunoglobulina M (IgM) are greutate moleculară mare (850 000—1 000 000 d) cu coeficient de sedimentare 19S şi este predominant repartizată în compartimentul intravascular. Ea reprezintă circa 10% din

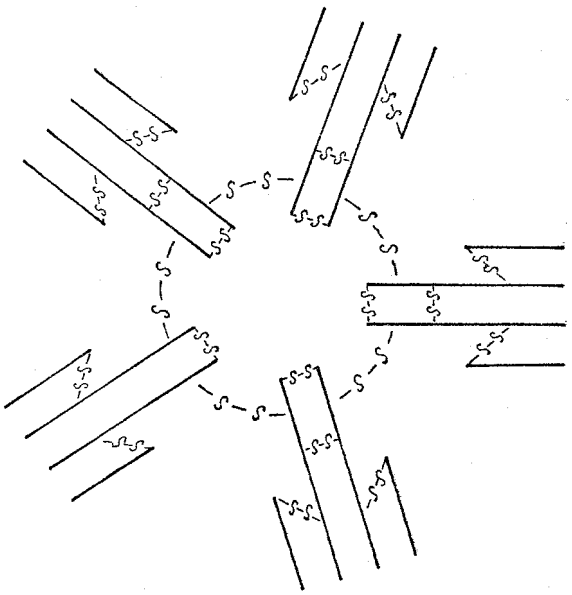
TABELUL 12.I

Subclasele IgA seric (11)

Subclase	Variante alotipice	Structura	Prezenţa (%) în	
			ser	secreţii
IgA_1	—		80	50
IgA_2	$A_2m(1)$ (90%)		20	50
	$A_2m(2)$ (10%)			

Ig, are un conţinut crescut de glucide (aproximativ 12% din greutatea sa, 5 grupe oligozaharidice/lanţ μ) şi apare sub forma a două subclase IgM_1 şi IgM_2. Se prezintă ca pentamer, cele 5 monomere 7S fiind legate disulfidic (fig. XII.6) şi având fiecare o greutate moleculară de aproximativ 180 000 d. Fiecare moleculă conţine un lanţ J legat disulfidic de două lanţuri μ. Molecula completă constă din 10 lanţuri μ, 10 lanţuri uşoare şi un lanţ J. Lanţul μ conţine 4 domenii constante (şi nu 3 ca majoritatea lanţurilor grele), fiecare legat de următorul prin punţi disulfidice la nivelul porţiunii sale carboxi-terminală. Între lanţurile grele există două legături disulfidice, una între domeniile C_H2 şi C_H3 şi cealaltă în apropierea extremităţii carboxi-terminale a lanţurilor grele. Monomerii sunt uniţi prin punţi disulfidice în al patrulea domeiu C_H4. S-a acceptat astfel, pentru întregul pentamer, structura circulară. Un timp nu s-a ştiut cine este responsabil pentru această configuraţie. O alternativă a fost, că întregul inel este compus din monomeri legaţi, împreună prin legături disulfidice, pentru a forma o brăţară. O altă alternativă numită „modelul agrafă" a considerat cei patru monomeri ataşaţi unul de altul prin legături disulfidice şi începutul şi sfârşitul inelului sunt ataşate unei structuri numite „proteină J" care acţionează ca o agrafă. Se pare că „modelul agrafă" este favorizat şi agrafa de lanţ J se poate vedea ţinând inelul de monomeri împreună în fig. XII.7 (10).

Fig. XII.6. — Reprezentarea schematică a structurii IgM umană (19).



IgM monomer există în concentrații mici în serul normal. Membranele celulelor B conțin receptori antigenici formați din IgM monomeric. IgM apare predominant în cursul răspunsului imun primar și are rol important în anumite boli autoimune. De asemenea are rol în cazurile de bacteriemie, deoarece apare timpuriu ca răspuns la infecție. Valența mare a IgM (teoretic 10, efectiv 5) îi permite a fi un agent aglutinant și citolitic eficient. Mulți dintre anticorpii grupelor sanguine sunt de tip IgM, ca de altfel și factorii reumatoizi și aglutinele la rece. Concentrația IgM crește în precipitarea la rece.

O singură moleculă de IgM fixată pe un antigen este suficientă să activeze complementul prin fixarea de clq și să inițieze cascada de

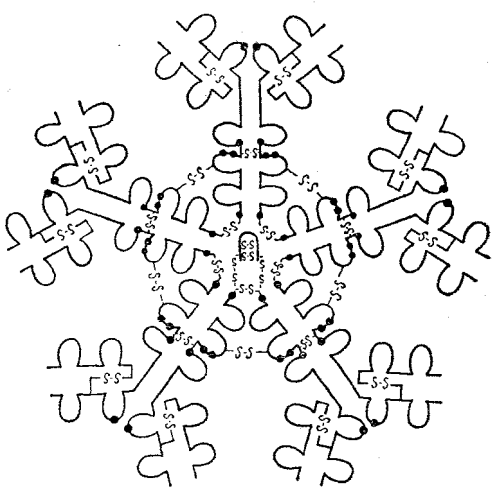


Fig. XII.7. — Posibila localizare a lanțului J în IgM uman (10).

reacții ale complementului, iar legarea este eficientă și la temperaturi mici.

Imunoglobulina D (IgD) are o masă moleculară de 180 000 d, este bogată în glucide (12%), se găsește în concentrații serice deosebit de mici (0,03 mg/ml, circa 0,2% din totalul Ig), dar este crescută la gravide și în timpul travaliului. Datorită concentrației sale atât de mici, studiul moleculei este foarte anevoios și este complicat și prin faptul că molecula este extrem de labilă. Este mult mai sensibilă la proteoliză și căldură decât celelalte clase de Ig și enzimele proteolitice din ser pot fragmenta molecula în timpul procedeelor de izolare. Structura IgD este mai puțin compactă decât cea a IgG, o singură legătură disulfidică leagă și lanțurile grele între ele și lanțul greu de cel ușor. Regiunea balama este mare, contribuind astfel la flexibilitatea sa, fapt care îi permite să lege efectiv încrucișat antigenul.

IgD prezintă o perioadă de înjumătățire în sânge scurtă (2,8 zile).

Moleculelor de IgD li s-a atribuit un rol de receptor „timpuriu" al limfocitelor B, în special la făt și nou-născut, ușurând stimularea lor pentru diviziune și diferențiere. Activitatea sa de anticorp a fost descrisă uneori pentru unele antigene, ca penicilina, proteinele din lapte, insulina, antigene nucleare și tiroidiene.

Imunoglobulina E (IgE) denumită anticorpul hemocitotropic sau reaginic are o greutate moleculară mare (180 000 d) datorită conținutului său glucidic de 12% și a existenței în structura sa a 5 domenii constante și variabile și există ca monomer. Domeniul C_ε 1 prezintă neobișnuit două legături disulfidice intralanț, iar cele două lanțuri grele ale moleculei sunt legate prin două punți disulfidice pe fiecare parte a domeniului C_ε2. Anticorpii IgE apar în cantitățile cele mai mici în serul uman (0,004% din totalul Ig) și răspund de hipersensibilitatea imediată de tip anafilactic. IgE are proprietatea de a se atașa prin porțiunea Fc pe receptori specifici de membrana de pe celulele omoloage circulante (bazofile, plachete) sau fixe (mastocite) și de a induce liberarea histaminei și a altor factori activi fiziologici. Această proprietate citotropică se pare că ar fi localizată în domeniul suplimentar carboxi-terminal al lanțului ε. (C_H4) al regiunii Fc. Prin combinarea cu anumite antigene specifice (alergeni) pe suprafața acestor celule, anticorpii IgE sunt implicați în degranularea mastocitelor cu formare de mediatori farmacologici (amine vasoactive), responsabili pentru reacțiile apărute prin expunerea pielii alergicilor la alergene (hipersensibilitate de tip I). Anticorpii IgE sunt astfel un exemplu de natură bifuncțională a moleculei anticorpice: regiunea Fc a moleculei ce leagă celulele circulare țintă și regiunea Fab ce leagă alergenul (17).

IgE este sensibilă la proteoliza enzimatică, participă la activarea complementului și prezintă o serie de proprietăți legate de fragmentul Fc, ca regularizarea transferului placentar și controlul catabolismului (C_H2), legarea de macrofage și mastocite (C_H3), reactivitatea față de factorul reumatoid.

Cele cinci tipuri de Ig enumerate sunt principalele clase cunoscute și studiate. Nu se poate afirma însă că lista lor ar fi închisă. Dintre candidații care încep să se profileze, se află receptorul antigenic al limfocitelor T care va aparține, eventual, viitoarei clase IgT (imunoglobulina celulei T) (12).

BIOSINTEZA IMUNOGLOBULINELOR

Imunoglobulinele posedă caracteristici metabolice diferite, iar concentrația lor serică este rezultatul balanței sinteză-catabolism. Astfel, în timp ce ratele de sinteză ale IgG și IgA sunt similare, concentrația IgA este mult mai mică decât a IgG datorită ratei catabolice mai mari a IgA. La IgD și IgE există o relație inversă între concentrația serică și rata catabolică, dar acestea sunt molecule deosebit de importante în relațiile lor celulare. Rata catabolică pentru IgM și Ig A este independentă de concentrația lor serică.

Sinteza moleculei de Ig este codată de două gene, una pentru regiunile variabile și una pentru regiunile constante ale moleculei (două gene pentru un lanț polipeptidic). Sinteza lanțurilor polipeptidice are loc la nivelul complexelor ribosomale (poliribosomi) în funcție de informațiile aduse de ARN-mesager. Un lanț L se sintetizează în aproximativ 30 de secunde, iar un lanț H în aproximativ 75 de secunde. Lanțurile H și L nou sintetizate se asamblează rapid în reticulul endoplasmatic în prezența unui exces de lanțuri L. Stabilirea legăturii H—H la om precede pe cea a legăturii H—L. Modalitatea de asamblare a lanțurilor H și L este dependentă de clasa și subclasa de imunoglobuline și reflectă labilitatea relativă a punților disulfidice intercatenare.

S-a sugerat de către Bevan (3) că formarea legăturilor disulfidice interlanț covalente urmează asamblării necovalente a lanțurilor într-o structură cuaternară stabilă.

În cazul celor două Ig care se găsesc sub formă de polimeri (IgM și IgA), polimerizarea are loc înainte sau în timpul secreției, probabil la trecerea prin membrana citoplasmatică. Acest proces necesită prezența lanțui J, care ajută legarea monomerilor, indiferent de mărimea lor, respectându-se raportul lanț J/polimer de 1/1.

La celula care secretă IgM nu există un exces al lanțului J sau a IgM monomere, IgM pentameră fiind exclusiv prezentă. La celulele ce secretă IgA, existând un deficit de lanț J se obține final un amestec de monomeri, dimeri și trimeri.

Fracțiunea glucidică a Ig se atașează în proporție de 2—14% în special în regiunea constantă a lanțurilor grele (C_H2) sub formă de legătură covalentă cu asparagina, mai rar cu serină sau treonină și include în principal galactoza, manoza, N-acetil-glucozamina și acidul sialic. Reziduurile de N-acetil-glucozamină se leagă prin legătură glicozilaminică de azotul aminic al unui reziduu de asparagină conținut în lanțul H. Acestea constituie puntea de legătură a celorlalte glucide. În general, fracțiunea glucidică este prezentă în componentul secretor (CS), în lanțul J și în regiunile C ale lanțurilor H și lipsește în lanțu-

rile L și în regiunile V ale lanțurilor H. Fracțiunii glucidice atașată Ig i se atribuie o serie de funcții ca facilitatea secreției plasmocitelor de către anticorpi, creșterea solubilității Ig și protejarea moleculelor de degradare, deși rolul ei nu este încă definitiv stabilit (18). Transferul glucidelor pe lanțul polipeptidic este catalizat de către o transglicozilază.

Viteza de asamblare a Ig depinde de concentrația lanțurilor L și H, de extinderea complementarității între lanțurile nou sintetizate (în special asupra regiunilor variabile), de viteza formării legăturii disulfidice și de viteza glicozilării înaintea secreției.

Circuitul asamblării, transportului și secreției de Ig (21) constă din sinteza lor de poliribosomi, transportul din lumenul cisternelor reticulului endoplasmatic către aparatul Golgi, unde se prind pe membrana internă prin intermediul regiunii Fc, încorporarea glucidelor în molecula de Ig în prezența glicozil-transferazelor, eliberarea în majoritate a moleculelor de Ig de pe membrana veziculelor Golgi, avansarea de pe suprafața celulei a veziculelor mici ce se contopesc cu membrana celulei, vezicule ce-și varsă conținutul în spațiul extracelular, eliberarea Ig legate de membrană care, probabil, se atașează de fragmente de membrană. Transportul în celulă durează 8—20 minute.

CATABOLISMUL IMUNOGLOBULINELOR

Asupra locului de catabolizare a Ig în organism se emit încă ipoteze. Totuși, se poate susține că sunt implicați sistemul reticuloendotelial, ficatul, intestinul subțire și rinichiul. Rinichiul joacă rol în catabolizarea lanțurilor ușoare ale Ig.

Rata catabolizării Ig este diferită: IgG și IgA o au asemănătoare, IgM o are de 5 ori mai mică, IgD de 100 de ori mai mică și IgE de 10 000 de ori mai mică.

Una din ipotezele asupra mecanismului catabolizării Ig (4) susține că majoritatea moleculelor native de IgG, fixate de celulă prin intermediul unor receptori, se pot reîntoarce în circulație, în timp ce moleculele de IgG uzate metabolic sunt degradate. Această ipoteză explică și mecanismul transportului transplacentar și transintestinal neonatal al IgG.

Ipoteza lui Gheție (13, 8) din contră, susține că de celule se fixează moleculele uzate metabolic sau „modificate" care au suferit o transformare conformațională în regiunea Fc și nu moleculele de IgG nativ. Deci, catabolizarea nu s-ar realiza de către celulele catabolizatoare, ci ar depinde de trecerea de la conformația formei „native" la cea „modificată".

BIBLIOGRAFIE

1. BAZIN H., ROUSSEAU J.: În Charpin J. (ed.): Allergologie. Edit. Flammarion, Paris, 1980, 33.
2. BERCEANU ȘT., PĂUNESCU E.: Biologia și patologia imunității, Edit. Academiei Române, 1981.
3. BEVAN M. J., PARKHOUSE R. M. E., WILLIAMSOME A. R., ASKONAS B. A.: Progr. Biophys. Molec. Biol. 1972; 25: 133.

4. BRAMBELL F. W. R., HEMMINGS N. A., MORRIS I. G.: Nature 1964; 203: 325.
5. EDELMAN G. M., GALL W. E.: Ann. Rev. Biochem. 1969; 38: 415.
6. FRANKLIN E. C.: În Miescher P. A., Müller H. J. (eds.): Textbook of immunopathology. Edit. Eberhard, Grune-Stratton, San Francisco, Londra, 1976.
7. GALLY J. A.: În Samter M. (ed.): Immunological disease. Little Brown Co., 1978, 49.
8. GHEȚIE V.: Microbiol. Parazitol. Epidemiol. 1972; 27: 317.
9. GHEȚIE V.: În Berceanu Șt. (ed.): Hematologie Clinică. Edit. Medicală, București, 1977, 157.
10. GOLUB E. S.: Immunology: A Synthesis, Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, 1987.
11. GOODMAN J. W., AN-CHUAN WANG: În Fudenber H. H., Stites D. P., Caldwell J. L., Wells J. V. (eds.): Basic clinical immunology. Lange Medical Publ., Los Altos, California, 1978, 23.
12. KUNKEL H. G.: În Lachmann P. J., Peters D. K. (eds.): Clinical aspects of immunology. Blackwell Sci. Publ., Oxford, Londra, Edinburg, Boston, Melbourne, 1982, 3.
13. MORARU I.: Imunologie, Edit. Medicală, București, 1984.
14. PORTER R. R.: Basic problems of neoplastic disease, Columbia Univ. Press, New York, 1962.
15. PORTER R. R.: The structure of antibodies. Sci. Amer. Publ., New York, 1967.
16. PUTNAM F. W.: The plasma protein, Academic Press, New York, San Francisco, Londra, 1975.
17. RICARDO M. J.: În Henry J. B. (ed.): Clinical diagnostic and management by laboratory methods. W. B. Saunders Co., Philadelphia, Londra, Toronto, 1979, 1214.
18. STANWORTH D., TURNER M. W.: În Weir D. M. (ed.): Handbook of experimental immunology, Blackwell Sci. Publ. Oxford, 1978, 61.
19. STEWARD M. W.: Immunochemistry, Edit. Chapman & Hall, Londra, 1974.
20. STEWARD M. W.: Antibodies: their structure and function, Edit. Chapman & Hall, Londra și New York, 1984.
21. SWENSON R. M., KERN M.: J. Biochem. 1967; 242: 3242.
22. TURNER M. W.: În GLYNN L. E., STEWARD M. W. (eds.): Immunochemistry. An advanced textbook, Edit. John Wiley, Chilchester, 1977, 1.
23. WALDMANN T. A., GHEȚIE V.: În Amos B. (ed.): Progress in immunology, Academic Press, New York, 1971, 1187.
24. ZAMFIRESCU-GHEORGHIU M.: În POPESCU A., CRISTEA E., ZAMFIRESCU-GHEORGHIU M. (ed.): Biochimie medicală, Edit. Medicală, București, 1980, 710.

XIII

SISTEMUL COMPLEMENT

ILEANA DIMA

Sistemul complement este un complex de enzime plasmatice, (proteine capabile să producă liza celulară), proteine reglatoare şi receptori pentru complement. Frecvent el „completează" nespecific acţiunea unui anticorp, motiv pentru care a primit numele de complement (termen introdus de Ehrlich), constituind împreună cu anticorpii, elementul esenţial al sistemului umoral de apărare împotriva agenţilor infecţioşi, de eliminare a lor şi altor antigene din sânge şi din ţesuturi.

Complementul joacă un rol şi în imunitatea de tip celular, datorită existenţei receptorilor pentru complement pe macrofage, polinucleare şi limfocite (receptorii joacă rol în interacţiunile celulare). Relaţia aceasta este confirmată şi prin existenţa unei legături genetice strânse între unele componente ale complementului şi complexul major de histocompatibilitate (HLA) (2, 11).

Proteinele circulante ale sistemului complement care reprezintă 5% din totalul proteinelor serice sunt în majoritate prezente în stare normală sub formă inactivă de proenzimă şi se activează succesiv una pe cealaltă într-o ordine dată („activare în cascadă"), ducând la formarea după clivare, a unor fragmente capabile să se fixeze pe suprafaţa membranelor celulare şi a unor fragmente mici nefixate, dar care posedă o activitate biologică bine definită (6).

Proteinele circulante ale sistemului complement sunt majoritatea β-globuline, termosensibile la 56°C, cu greutate moleculară între 24 000 şi 410 000 daltoni şi au ca principal loc de sinteză ficatul şi macrofagele tisulare, dar pot fi produse şi de alte celule, ca monocitele, fibroblaştii, celulele adipoase, celulele epiteliale din tractul digestiv şi căile genito-urinare. Trebuie menţionat că în plămân multe tipuri de celule, cum sunt celulele alveolare de tip II, celulele epiteliale, macrofagele alveolare, fibroblaştii pot sintetiza componentele C1, C2, C3, C4, C5, precum şi factori ai căii alterne, ceea ce face posibilă o activare locală a cascadei

complementului, proces considerat ca putând contribui în producerea sindromului de detresă respiratorie.

Componentele complementului pot fi grupate în trei categorii funcționale: 2 unități de recunoaștere conducând la activări paralele, dar distincte și o unitate terminală comună.

Activarea complementului este declanșată fie pe calea clasică fie pe calea alternă, care se întâlnesc pe un trunchi comun, complexul terminal (litic).

Complementul este activat rapid și izolat, ceea ce implică mecanisme de amplificare și control. Relativ recent au fost descrise proteine de membrană:

— fie receptori celulari pentru fragmentele complementului, care facilitează interacțiunea cu particulele opsonizate;

— fie proteine de control jucând un rol de protecție a gazdei, evitând activarea complementului.

Activarea în cascadă a diferitelor sale componente este la originea apariției unor activități biologice variate:

— apărarea organismului împotriva agenților infecțioși: bacterii, virusuri, levuri, paraziți;

— medierea directă a reacțiilor inflamatorii;

— metabolismul complexelor imune;

— interacțiuni celulare;

— procese imunopatologice conducând la leziuni celulare sau tisulare.

PROTEINELE COMPLEMENTULUI

Sistemul complementului cuprinde peste 30 de proteine plasmatice și de membrană. Componentele căii clasice și ale complexului litic sunt proteine reprezentate prin litera C și numerotate de la C1 la C9 (fig. XIII.1).

Cea mai mare parte a componentelor sunt β-globuline cu greutate moleculară între 85 000 și 410 000 daltoni și sunt constituite din unul sau două lanțuri peptidice unite prin punți disulfidice. Excepție fac C4 și C8 cu trei lanțuri peptidice și C1 care este format din 3 proteine distincte: Clq, Clr și Cls. Lanțurile peptidice sunt notate cu litere grecești, de exemplu C4α, C4β și C4γ. Fragmentele rezultate prin clivarea enzimatică a factorilor inițiali sunt reprezentate cu litere mici C3a, C3b. Litera i desemnează o moleculă inactivă: iC3b. C3 are concentrația serică cea mai ridicată (600—1 800 mg/l) și fixarea sa este reacția principală, analogă transformării fibrinogenului în fibrină în cursul coagulării (29). Componentele activate sunt reprezentate printr-o linie orizontală trasată deasupra numărului (exemplu: $\overline{C1}$).

Proteinele căii alterne (numită și bucla de amplificare) sunt desemnate cu litere mari: P (properdina), factorul B (C3 proactivator sau C3PA), factorul D (C3 proactivator convertaza). Greutatea moleculară a proteinelor căii alterne este între 24 000 și 180 000 daltoni (fig. XIII.2). Fragmentele având proprietatea de a se fixa pe o membrană celulară sunt marcate cu un asterisc (exemplu: C3b*).

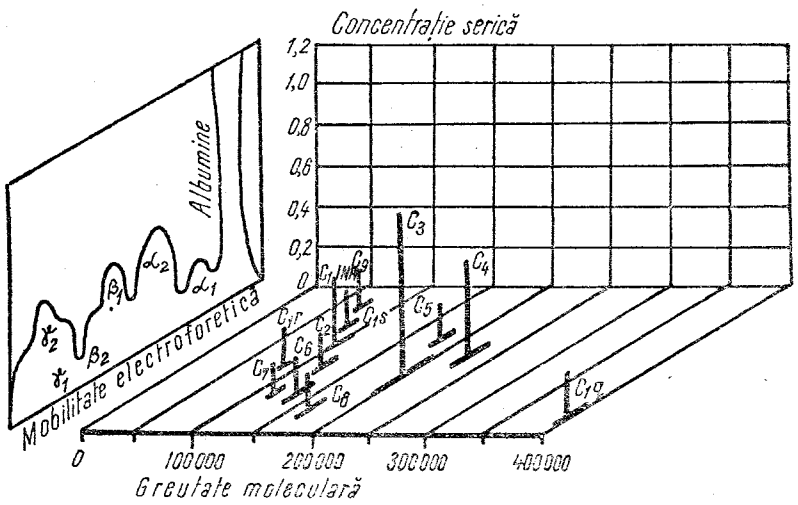


Fig. XIII.1. — Proteinele căii clasice a complementului (după Roit).

În reacția de imunohemoliză, eritrocitul este simbolizat cu litera E, anticorpii fixați pe membrană și amorsând fixarea complementului cu litera A.

Proteinele reglatoare, în general cu rol inhibitor sunt:

— plasmatice: C1—INH (inhibitorul lui C1), C4bp (proteina de legare a C4), factorul I sau C3b — INA (inactivatorul lui C3b sau KAF), factorul H (β1H — globulina), S (inhibitorul complexului litic);

— de membrană: factorul accelerator al degradării DAF (*Decay Accelerating Factor*, CD55), proteina cofactor de membrană MCP (*Membrane cofactor Protein* sau CD46), factorul de restricție omolog HRF (*Homologous Restriction Factor*), HRF20 (CD59, PROTECTIN, MIRL),

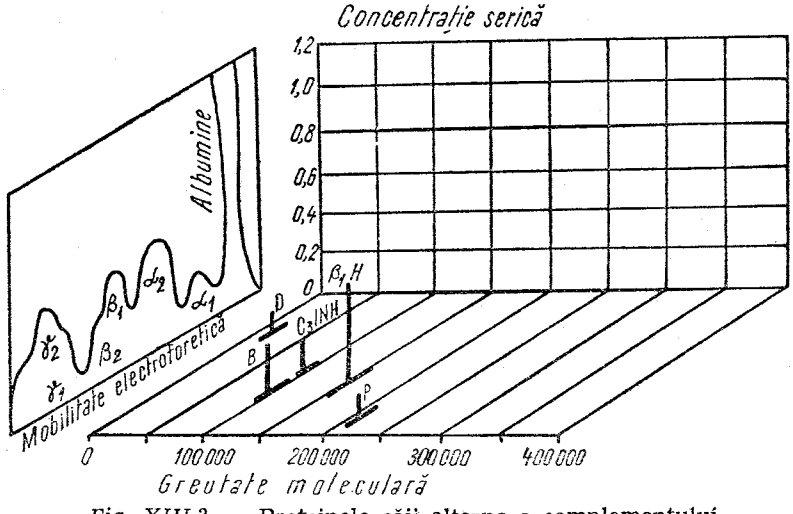


Fig. XIII.2. — Proteinele căii alterne a complementului.

TABELUL 13.I

Proteinele sistemului complement*

		Simbol / Sinonim	Greutate moleculară (Da)	Concentrație serică (μg/ml)
Calea clasică	Activare	C1q	410 000	70
		C1r*	85 000	35
		C1s*	85 000	70
		C2*	117 000	45
		C4	200 000	400
		C3	185 000	1 400
	Reglare	C1-INH — Inhibitorul lui C1	105 000	180
		C4bp — Proteina de legare C4	1,2—1,5 10^6	250
		I* — Inactivatorul lui C3b-(C3b--INA, KAF)	90 000	50
Calea alternă	Activare	C3 —	185 000	1 400
		B* — C3 proactivatir (C3PA)	95 000	250
		D* — C3 proactivator convertază	25 000	2
		P — Properdina	220 000	25
	Reglare	H — β1H	150 000	400
		I*	90 000	50
Complexul litic	Activare	C5	200 000	160
		C6	130 000	75
		C7	120 000	65
		C8	155 000	80
		C9	79 000	200
	Reglare	S — Inhibitorul complexului litic (vitronectina)	88 000	600
	Proteine de membrană	DAF — factorul de accelerare a degradării (CD55)	70 000	?
		MCP — proteina cofactor de membrană (CD46, gp45, 70)	70 000	?
		HRF — factorul de legare a lui C8 (C8bp)	65 000	?
		HRF20 — factorul de inhibiție a complexului litic (CD59, MACIF, MIRL)	20 000	?
	Receptori pentru complement	CR1 (CD35)	200 000	
		CR2 (CD21)	140 000	
		CR3 (CD11b/CD18) =	180 000	
		CR4 (CD11c/CD18); p150, 95 =	95 000	
		CR5 =	150 000	
		C5a =	95 000	
		C3a		
		C1q		

* Proteine cu activitate enzimatică.

carboxipeptidaza N (inhibitorul anafilatoxinelor) și CR1 (are mai ales funcție de receptor) (tabelul 13.I) (1, 2, 22, 9).

Sinteza, catabolismul și genetica proteinelor complementului. Locurile de sinteză ale diferitelor componente ale complementului sunt încă incomplet cunoscute. Mai multe tipuri de celule par să le sintetizeze: hepatocitele, macrofagele, monocitele circulante, celulele epiteliale ale

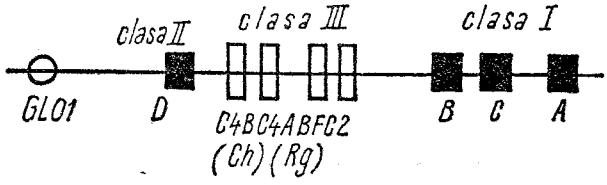


Fig. XIII.3. — Localizarea genelor factorilor C2, B și C4 în complexul major de histocompatibilitate pe cromosomul G.
(Rg.: Rogers; Ch: Chido)
Centromerul este situat la stânga.

intestinului, ale vezicii biliare, fibroblastele. Proteinele complexului litic par să fie sintetizate cel puțin în parte de limfocite.

La naștere, organismul conține cam jumătate din concentrația serică în complement de la adult (3).

După primii doi ani de viață, concentrația serică a complementului atinge nivelurile întâlnite la adultul normal (1).

Studiul metabolismului diferitelor componente a arătat că timpul de înjumătățire este scurt — de la câteva ore la 60 de ore (în medie 24 de ore). Complementul are deci un turnover și în consecință o sinteză rapidă, ceea ce reflectă un consum permanent (2).

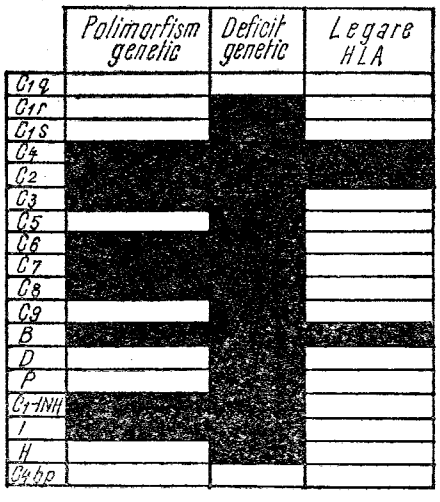


Fig. XIII.4. — Genetica proteinelor complementului (după Bach).
Culoarea închisă arată proteinele pentru care există polimorfism genetic, deficit genetic sau o legare la complexul HLA.

Studii biochimice privind sinteza de C3 și C4 au arătat că aceste proteine sunt sintetizate sub formă de precursori formați dintr-un singur lanț polipeptidic care este clivat în 2 și 3 lanțuri.

Genele de structură ale componentelor C2, C4 și B sunt localizate pe brațul scurt al cromozomului 6, în apropierea locusului HLA-B, ele constituind clasa a III-a de gene a complexului major de histocompatibilitate (HLA) (fig. XIII.3) (2, 11).

Celelalte componente ale sistemului complement nu sunt legate la HLA (tabelul 13.II) (26).

Unele componente au specificități allotipice al căror polimorfism a fost bine studiat și demonstrat pentru: C3, B, C2, C4, C6 și C7 (fig. XIII.4).

TABELUL 13.II

Genele proteinelor complementului

Cromosom	Proteină
1p	C1q(B), C8α, C8β
1q	H, C4bp, CR1, CR2, DAF, MCP
4	1
5	C9, C6, C7
6	B, C2, C4
11	C1-INH
12	C1r, C1S
19	C3
x	P, D
9	C5, C8γ

ACTIVAREA COMPLEMENTULUI

Componentele complementului în stare nativă sunt lipsite de efecte biologice, iar pentru declanșarea procesului de activare este necesar un stimul.

Activarea complementului se desfășoară în cascadă. Primul component cu activitate proteolitică clivează specific al doilea component în două fragmente, din care unul dobândește activitate proteolitică specifică pentru al treilea component și astfel în continuare. Fapt particular la acest sistem enzimatic, enzima activatoare trebuie în anumite cazuri, să fie fixată pe o membrană celulară, ceea ce limitează activarea în fază pur fluidă. Acest transfer de proteine plasmatice pe o suprafață este secundar activării unui situs de legare pentru membrane celulare. Factorii C2, C3, C4, C5 și B după ce au fost activați prin clivaj, prezentând într-un timp foarte scurt (mai puțin de 10 milisecunde) un situs de legare la membrane (în cazul lui C3b, C4b și C5b) sau la un acceptor proteic deja fixat pe o membrană (C3b pentru factorul B, C4b pentru C2).

În lipsa întâlnirii acestui acceptor în timp util, molecula rămâne liberă în circulație unde este rapid inactivată (1, 2, 25, 29).

În cazurile lui C3 și C4 acest situs corespunde la o punte tioester internă relativ instabilă, capabilă după scindare de a se fixa printr-o legătură covalentă pe o particulă (fig. XIII.5) (2, 22).

Activarea complementului se face pe 2 căi, clasică și alternă, a căror funcție primară este generarea de C3 convertaze: convertaza C3/C5 pentru calea clasică și convertaza C3 pentru calea alternă.

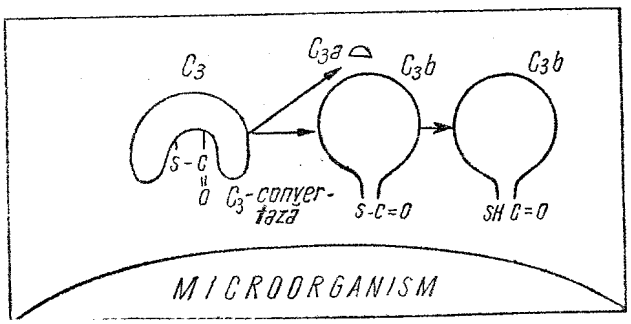


Fig. XIII.5. — Legarea lui C3b la suprafața microorganismelor mediată de tioester. Prin activarea lui C3b tioesterul devine ușor accesibil și face o legătură covalentă cu un acceptor, ca de exemplu: hidroxil sau amino pe suprafața țintă (după Kinoshita).

Calea clasică. Calea clasică este în general activată prin interacțiunea C1 cu complexe antigen-anticorp ce conțin IgM sau IgG sau cu imunoglobuline agregate. La om singurele imunoglobuline care se pot fixa la C1 sunt IgM, IgG1, IgG2 și IgG3 (2, 3, 17, 18, 25); IgG4, IgA și IgE nu pot activa complementul.

Mai rar activarea poate fi declanșată prin anumite substanțe ca: anioni, polizaharide, enzime, alte substanțe (tabelul 13.III) (25).

O singură moleculă de IgM fixată pe o membrană celulară (exemplu: un eritrocit) este suficientă pentru a fixa C1, în timp ce pentru IgG sunt necesare cel puțin 2 molecule (dublet de IgG) fixate la situsuri foarte apropiate (25—40 nm) (3, 25, 29). Aceasta implică necesitatea ca situsurile antigenice la suprafața eritrocitului să fie suficient de numeroase pentru a crește șansa ca două molecule IgG să ocupe situsuri adiacente pe celulă și să permită astfel fixarea C1. Astfel se explică faptul că anticorpii anti-D obișnuit de tip IgG nu fixează complementul (20 000 situsuri antigenice pe eritrocit), în timp ce anti-A de tip IgM (10^6 situsuri antigenice pe eritrocit) fixează complementul. De asemenea, o moleculă IgM trebuie să se poată atașa prin două situsuri la membrana celulară, ceea ce explică de ce anumite IgM nu pot să fixeze complementul în lipsa situsurilor antigenice suficiente (25).

Activarea căii clasice, în care sunt implicate 9 proteine: C1 până la C9, poate fi divizată didactic în două etape: recunoașterea și formarea C3/C5 convertazei.

Etapa de recunoaștere. Recunoașterea complexului antigen-anticorp este realizată pe calea clasică de către componentul C1. C1 este un complex proteic particular format din trei subunități proteice: C1q, C1r și C1s. C1q

TABELUL 13.III

Substanțe activatoare ale căii clasice
(după M. Lafontain)

Imunoglobuline	IgG3 +++, IgF1 +, IgG2 ±, IgM
Anioni	ADN, ARN, condroitin-sulfat, Acizi: poliinozinic, poliguanilic și poliuridilic
Polizaharide	Dextran
Enzime	Tripsina, plasmina, enzime lizosomiale
Alte substanțe	Endotoxine, membrane limfocitare, anvelope virale, proteina C reactivă (CRP), soluții la concentrație ionică slabă

este o proteină de 410 KDa formată din 18 lanțuri peptidice reunite în trei subunități de câte 6. Fiecare subunitate este formată din 2 triple helix peptidice în formă de Y, reunite prin tija lor și terminându-se printr-un cap nehelicoidal globulos.

Lanțurile peptidice au structură asemănătoare colagenului (glicină, prolină, izoleucină sau hidroxilizină). Aspectul C1q în microscopia electronică este indicat în fig. XIII.6 (29). Receptorii pentru fixarea la imunoglobulina complexată sunt situații la extremitatea globuloasă.

C1q se leagă la fragmentele Fc ale IgG sau IgM din complexul antigen-anticorp prin subunitățile sale globuloase, evocând un buchet de 6 lalele (2, 31). După fixarea la fragmente Fc ale imunoglobulinelor combinate cu antigenul, C1q activează C1r în prezența ionilor de calciu printr-o reacție de proteoliză.

C1r activat clivează la rândul său C1s (activare în cascadă) transformându-l în C1s activat ce devine o enzimă. C1r și C1s prezintă asemănări în structura primară și în ce privește funcția (2, 22).

Ele au apărut prin duplicație genică. Cele 2 proteine au specificitate enzimatică diferită: C1s este substratul lui C1r; C1s (nu C1r) activează C4 și C2, componentele următoare ale căii clasice. Deci C1q, C1r și C1s trebuie considerate ca un sistem enzimatic.

Formarea C3/C5 convertazei. C1s activat clivează în același timp C4 și C2. C1s detașează un peptid de 6 KDa (C4a) la extremitatea N-terminală a lanțului α a lui C4, lăsând un fragment numit C4b. Această reacție are loc în plasmă în jurul situsului catalitic al C1s. C4b se leagă foarte aproape de situsul de activare, fie la complexul C1qrs, fie la membrana eritrocitară apropiată. Moleculele de C4b nefixate se inactivează în mediu prin pierderea situsului activ.

C1s este foarte activ pe C2 complexat la C4b în prezența ionilor de Mg^{++}. Un mic fragment C2b (30 KDa) este liberat în mediu și un fragment mai mare C2a (70 KDa) se unește cu C4b pentru a forma enzima $\overline{C4b2a}$ (fig. XIII.7). Aceasta constituie C3 convertaza căii clasice și al cărui situs enzimatic clivând C3 se află pe molecula de C2.

Complexul $\overline{C4b2a}$ clivează C3 în 2 fragmente:

- C3a (anafilatoxina C3), peptid mic de 9 KDa la extremitatea N-terminală a C3;
- C3b, un fragment mai mare al C3, care prezintă un situs de legare trioester (vezi fig. XIII.5).

Unele fragmente C3b se depun în apropierea situsului de clivaj formând complexul $\overline{C4b2a3b}$ (fig. XIII.8).

Acest complex are proprietatea de a cliva C5, cu condiția ca acesta să fie prezentat fixat la o moleculă de C3b.

Complexul $\overline{C4b2a}$ are deci o funcție centrală în activarea căii clasice. El este responsabil prin clivarea lui C3 apoi C5 de toate efectele biologice ale acestei căi. Durata de viață este scurtă având în vedere instabilitatea sa și existența proteinelor de control (1, 2).

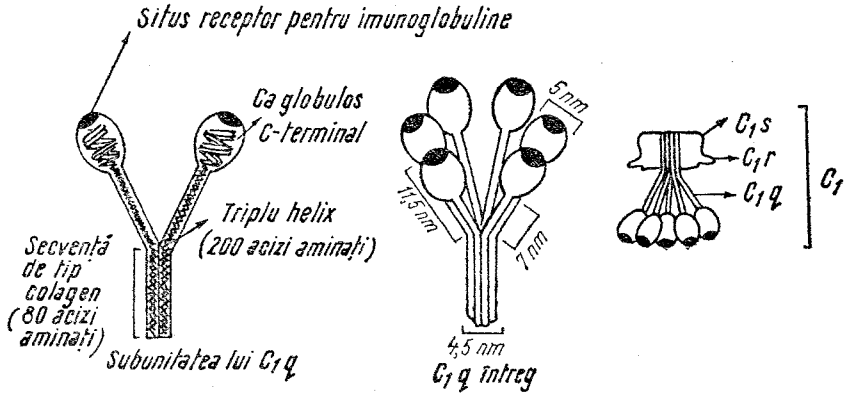


Fig. XIII.6. — Structura C1 (după Roit).

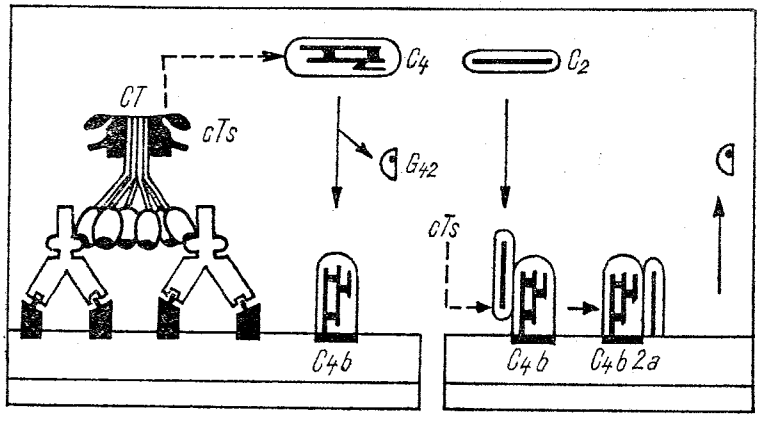


Fig. XIII.7. — Formarea $\overline{C4b2a}$, C3-convertaza căii clasice.

$\overline{C1s}$ clivează C4, liberând fragmentul C4a. C4b se leagă la membrana apropiată prin intermediul punții tioester. C2 din ser se leagă la C4b în prezența Mg^{++} și este clivat de $\overline{C1s}$, liberând C2b și dând naștere la $\overline{C4b2a}$, C3-convertaza căii clasice.

Reglarea căii clasice. Activarea complementului este supusă unei duble reglări.

Reglarea intrinsecă datorită labilității activității proteolitice a C1 esterazei și C3/C5 convertazei.

Reglarea extrinsecă este realizată de proteinele de reglare.

C1-INH (inhibitorul C1) inhibă activarea C1, disociază C1 activat, inhibă clivarea C4 de către C1s.

C4bp (proteina de legare a C4) disociază C4b2a, are rol de cofactor, permițând factorului I să cliveze și să inactiveze C4b (C4c și C4d).

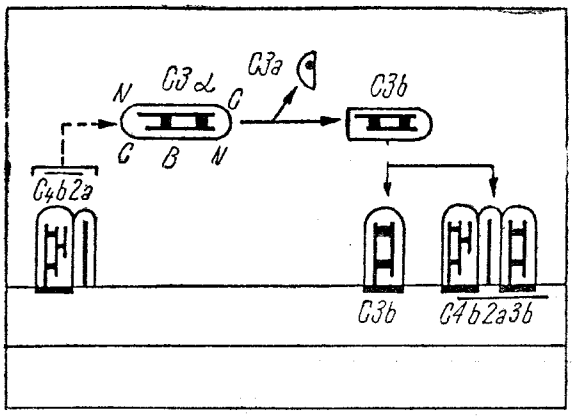


Fig. XIII.8. — Acțiunea complexului $\overline{C4b2a}$ asupra C3, formarea complexului $\overline{C4b2a3b}$ care este C5-convertaza căii clasice (după Roit).

$\overline{C4b2b}$ detașează anafilatoxina C3a de la extremitatea N-terminală a peptidului α a lui C3. O punte tioester internă este expusă pe C3 și antrenează legarea unor molecule de C3b în apropierea complexului $\overline{C4b2a}$. Una din aceste molecule se va lega la $\overline{C4b2a}$ pentru a forma $\overline{C4b2a3b}$, C5 convertaza căii clasice.

DAF (decay accelerating factor, CD55) este o proteină reglatoare de membrană prezentă pe toate celulele sanguine, celulele endoteliale și epiteliale. Ea este formată dintr-un lanț de 70 KDa care prezintă un domeniu glicolipidic, glucozil fosfatidilinozitol (GPI), permițând inserția membranară și facilitând mișcările rapide în membrană. Această particularitate este împărțită cu acetilcolinesteraza eritrocitului și antigenul Thy-1 (θ) de pe celulel T (2, 34).

Calea alternă. Complementul poate fi activat pe calea alternă în absența complexului antigen-anticorp, de mai multe substanțe (tabelul 13. IV).

Cantități mici de C3b sunt formate în permanență în plasmă prin proteoliza C3 nativ.

Activarea căii alterne se declanșează când moleculele de C3b se depun pe suprafața unui activator al căii alterne.

Pe lângă C3 și C5 care sunt comune ambelor căi de activare, la calea alternă mai participă încă 5 proteine: Factorul B, Factorul H, Factorul I și properdina.

Formarea C3 convertazei alterne. În prezența ionilor de magneziu, C3b și B formează un complex bimolecular C3bB.

Factorul D clivează factorul B angajat în acest complex în Bb și un mic fragment Bc (33 KDa) pe care-l detașează.

TABELUL 13.IV

Substanțe activatoare ale căii alterne

Polizaharide	— Inulină, agar, endotoxine bacteriene, peretele bacteriilor, virusurilor, fungilor, paraziților, unor celule tumorale, eritrocite de iepure, ADN, proteina C-reactivă, membrane mitocondriale
Agregate de imunoglobuline	— IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 — IgA1, IgA2 IgD IgE
Alte substanțe	— Venin de cobra, tripsină, factorul nefritic

Astfel se formează complexul $\overline{C3bBb}$ cu activitate de C3 convertază, al cărui situs enzimatic se află pe fragmentul Bb.

Enzima $\overline{C3bBb}$ clivează C3, formând noi molecule de C3b capabile la rândul lor să formeze, după reacția cu B și D, noi convertaze alterne și bucla de amplificare continuă. Factorii H și I controlează acest sistem de amplificare al căii alterne.

Există o analogie între C3 — convertaza alternă și C3/C5 — convertaza clasică. Ca și complexul C4b2a, complexul $(C3b)_nBb$ poate, atunci când este fixat pe o membrană, să cliveze C5, cu condiția ca acesta din urmă să-i fie prezentat la o altă moleculă de C3b depusă în apropiere (fig. XIII.9).

Reglarea căii alterne. Un punct de control al buclei de amplificare depinde de stabilitatea convertazei C3bBb.

Aceasta se inactivează prin pierderea Bb, având o durată de viață de $\sim$5 minute. Dacă properdina (P) se leagă la C3bBb, formează $\overline{C3bBbP}$ cu o durată de viață de $\sim$30 minute potențând acțiunea C3 convertazei alterne.

• Prin legarea factorului H la C3b, care intră în competiție cu factorul B, convertaza alternă C3bBb își pierde activitatea. Factorii H și B ocupă un situs comun pe C3b și natura suprafeței la care este fixat C3b comandă factorul care se leagă preferențial la C3b.

Moleculele de C3b produse în permanență, chiar în prezența proteinelor de reglare la omul sănătos (bucla de amplificare funcționează încet), pot avea 3 transformări:

— să rămână în soluție în plasmă;

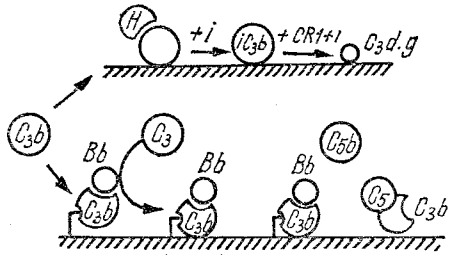


Fig. XIII.9. — Mecanismul activării căii alterne (după Bach).
Molecula C3b fixată la o particulă neactivatoare (hematia gazdei) sau în faza fluidă este rapid inactivată de către I în prezența lui H și CR1. C3b fixat la un activator al căii alterne (bacterie gram-negativă) scapă efectului inhibitor exercitat de H, CR1 și I și poate participa la activarea altor molecule de C3 și C5.

— să se depună pe o membrană celulară neactivatoare (exemplu: eritrocitul gazdei) sau

— să se lege la o substanță activatoare a căii alterne (exemplu: bacterie Gram-negativă).

În primele două cazuri C3b este foarte repede inactivat sub efectul proteinei reglatoare H care se fixează pe C3b.

• Această legătură modifică lanțul α al lui C3b, astfel încât permite să fie clivat de către *inactivatorul lui C3b (C3b-INA)* (fig. XIII.10).

Deci H legat la C3b are și rol de cofactor enzimatic pentru I, facilitându-i acțiunea. I clivează C3b în iC3b în prezența de H sau CR1 (receptor pentru C3b).

iC3b este molecula inactivă incapabilă să se lege la B și să formeze C3-convertaza. iC3b este degradat de I în C3c și C3dg, numai în prezența lui CR1 (la forță ionică nefiziologică).

Când C3b se depune pe o suprafață activatoare, interacțiunea cu membrana particulei face molecula de C3b inaccesibilă pentru H și îi permite să scape controlului inhibitor, formând astfel o C3-convertază. Reacția în lanț a buclei de amplificare se dezvoltă la suprafața particulei și conduce la depozitarea de numeroase molecule C3b.

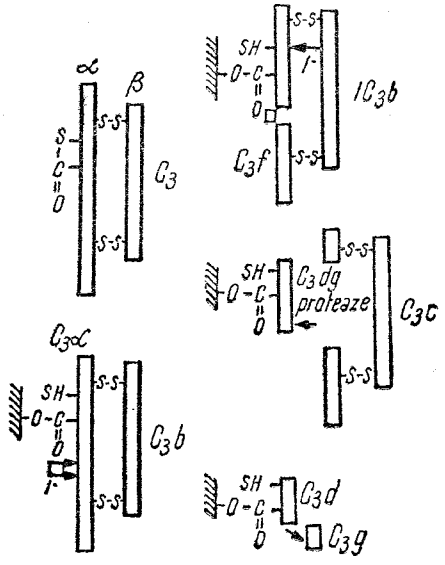


Fig. XIII.10. — Activarea lui C3 și degradarea sa de către proteinele de reglare (după Bach).
C3-convertaza activează C3 în C3a și C3b; C3b este degradat succesiv în iC3b, apoi C3dg de către I în prezența lui H sau CR1. Atunci când clivarea lui iC3b sau C3dg nu are loc la forța ionică fiziologică, aceasta nu se realizează decât în prezența lui CR1.

C3b apare ca un compus de „recunoaștere" pentru calea alternă deoarece el deosebește activatorul de neactivator: vor fi activatori substanțele care, datorită unei structuri polizaharide particulare, leagă C3b făcându-l inaccesibil proteinei H.

Importanța fiziologică a reglării căii alterne este demonstrată de existența unui consum accelerat și total de C3 circulant în cazul deficitului genetic în I (26).

• *MCP (CD46, membrane cofactor proteins* sau gp45, 70) constituie un nou grup de proteine reglatoare, prezente pe un mare număr de celule, dar, spre deosebire de DAF, ele nu se găsesc pe eritrocite. MCP favorizează acțiunea factorului I, inhibând activarea C3. Ele joacă un rol complementar lui DAF care intervine și în reglarea căii alterne disociind C3-convertaza alternă (sau împiedică asocierea C3b cu factorul B) (2, 24).

Anumite proteine pot acționa calea alternă făcând C3-convertaza alternă inaccesibilă proteinelor reglatoare.

• *Factorul veninul de cobra (FVC),* care nu este altceva decât C3b cobra, capabil să formeze cu B uman o C3-convertază (FVC-Bb) insensibilă la acțiunea lui H și I.

• În patologie, o activare prelungită a complementului poate induce formarea unui autoanticorp anti-C3-convertază. Cel mai cunoscut, *factorul nefritic (C3NeF)* este un autoanticorp (IgG3) anti-C3-convertaza alternă (C3bBb), care stabilizează complexul ce rezistă acțiunii lui H. El induce un catabolism accelerat al C3 și în consecință o scădere permanentă a nivelului seric al acestuia (1).

Funcția proteinelor sistemului complement în activarea și reglarea complementului este redată în tabelul 13.V.

Compararea căilor clasică și alternă. Figura XIII.11 compară căile clasică și alternă a complementului.

Calea alternă furnizează o imunitate „înnăscută" nespecifică, în timp ce calea clasică reprezintă un mecanism mai recent care conferă o „imunitate adaptativă" specifică, asociată la „memorie" (9, 29).

Activarea complementului pe calea clasică prin complexele imune conținând IgM sau IgG este o rapidă și eficientă cale pentru activarea complexului terminal (18).

Cele două căi generează o C3-convertază care clivează C3 în C3a și C3b. C3b — elementul central al activării complementului — activează la rândul său secvența terminală litică, C5-C9.

Analogie structurală și funcțională între anumite componente ale complementului. Există numeroase analogii structurale și funcționale între diferitele proteine ale complementului.

Cea mai frapantă este *analogia existentă între C2 și factorul B:*

• aceste 2 componente, care posedă situsul enzimatic al C3-convertazei clasice (C2) și alterne (B) necesită pentru activarea lor prezența ionilor de magneziu;

TABELUL 13.V

Funcția proteinelor sistemului complement în activarea complementului

Proteina	Fragmente de clivaj	Funcția
1	2	3
C1q		Recunoașterea activatorilor căii clasice
C1r	C1r	C1r clivează C1s în C1r2s2 după legarea lui C1q la activator
C1s	C1s	C1s clivează C4 și C2;
C2	C2a: clivajul lui C2 de C1s C2b: clivajul lui C2 de C1s	Substratul C1s C2a în complexul C4b2a clivează C3; C2a în complexul $(C3b)_nC4b2a$ clivează C5
C4	C4a: clivajul lui C4 de C1s C4b: clivajul lui C4 de C1s C4c și C4d: clivajul lui C4b de I	Substratul lui C1s Anafilatoxină C4b se leagă la activator: C4b legat formează cu C2a C3-convertaza clasică C4b2a
C3	C3a: clivajul lui C3 de C3-convertaze C3b: clivajul lui C3 de C3-convertaze iC3b: clivajul lui C3b de I C3c și C3dg: clivajul lui iC3b de I C3d și C3g: clivajul lui C3dg de proteazele tisulare	Substratul C3-convertazei clasice și alterne Anafilatoxină C3b se leagă la suprafețe: C3b legat formează cu B C3-convertaza alternă; contribuie la formarea C5-convertazei clasice și alterne; ligandul lui CR1 Ligandul receptorului CR3 C3dg este ligandul receptorului CR2 C3d este ligandul lui CR2
B	Ba: clivajul lui B de către D Bb: clivajul lui B de către D	Se leagă la C3b pentru formarea C3-convertazei alterne Bb în complexul C3bBb clivează C3 Bb în complexul $(C3b)_nBb$ clivează C5
D		Clivează B în complexul C3bB
C5	C5a: clivajul lui C5 de C5-convertaze C5b: clivajul lui C5 de C5-convertaze	Substratul C5-convertazelor clasică și alternă Anafilatoxină C5b se leagă la C6

(Continuarea tabelului 13.V)

1	2	3
C6		Se leagă la C5
C7		Participă la elaborarea complexului C5b-8, care poate să se insere în membrane
C8		Se leagă la C5b-7
C9		Mai multe molecule de C9 se leagă la C5b-8 formând pori în membrană
Reglatoare: PLASMA C1-INH		Inhibă activarea lui C1; disociază C1 activat, inhibă clivajul lui C4 de C1s
C4bp		C4bp disociază C4b2a; este cofactor la clivarea lui C4b de I
I		Endopeptidază: clivează C4b în C4c şi C4d Endopeptidază: clivează C3b legat în iC3b şi iC3b în C3c şi C3dg
P		Stabilizează complexul C3bBb şi $(C3b)_nBb$)
H		Disociază C3bBb: previne formarea C3bBb şi $(C3b)_nBb$; cofactor pentru I în clivarea lui C3
S		Se leagă la C5b-7 în fază solubilă, împiedică inserţia complexului în membrane
MEMBRANĂ DAF		Disociază C3-convertazele, protecţie instrinsecă împotriva activării complementului pe celule autologe
MCP		Cofactorul lui i: inhibă activarea C3
HRF (C8bp)		Leagă C8, inhibând complexul litic
CD59(HRF20)		Inhibă acţiunea complementului autolog, legând C8 şi C9

• ele au caracteristici fizicochimice comune și sunt ambele codificate de gene localizate în complexul major de histocompatibilitate (HLA) (vezi fig. XIII.4). Aceste analogii sugerează că cele 2 căi de activare a complementului au origine comună (2, 22).

La fel *C3 și C5* care:

• clivate sunt la originea tuturor efectelor biologice ale complementului;

• prezintă importante similitudini în secvența acizilor lor aminați.

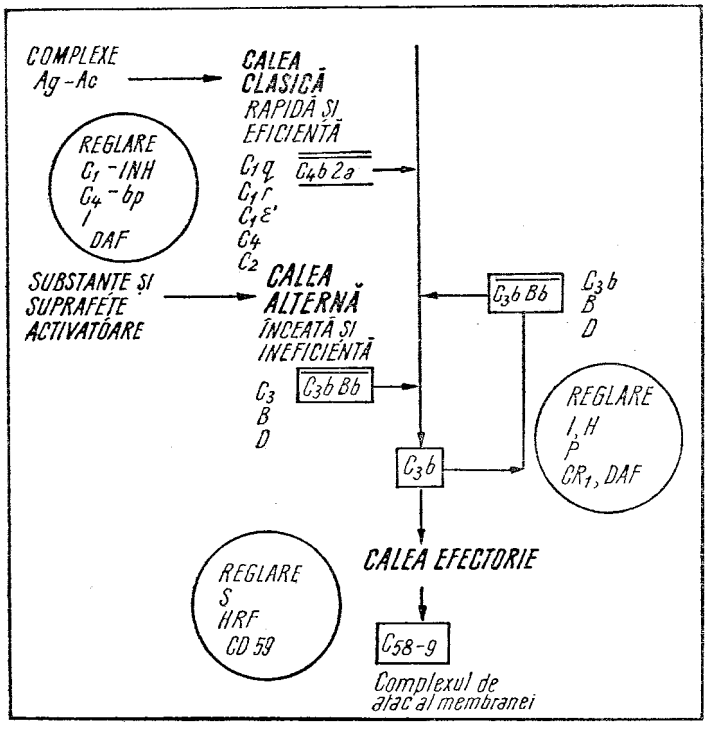


Fig. XIII.11. — Căile de activare a complementului (după Assim — adaptată).

Analogii secvențiale sunt regăsite pentru *C1r, C1s* și *factorul D*, de o parte, și pentru *C6 și C7*, de altă parte.

Proteinele H, C4bp, CR1, CR2 și DAF au:

• omologii de structură între ele;

• genele care codifică aceste 5 proteine sunt situate pe același cromosom 1 (tabelul 13.VI) (26).

Astfel, în cursul evoluției, plecând de la un sistem rudimentar, sistemul complement a dobândit probabil selectivitatea sa și eficacitatea sa prin dublarea, respectiv triplarea, anumitor proteine care îl compun.

Formarea complexului de atac al membranei. Citoliza indusă de complement este în întregime dată de acțiunea complexului litic, care este constituit din 5 proteine: câte o moleculă de C5, C6, C7, C8 și multiple molecule (până la 18) de C9.

TABELUL 13.VI

Proteinele complementului și rolul lor în procesele imunologice
(după A. Erdei)

Proteina	Rol
C1q	Legarea complexelor imune; creșterea fagocitozei; creșterea sintezei inhibitorului IL—1; mediator al fenomenului de citotoxicitate
Ba	Inhibiția proliferării limfocitelor B
Bb	Stimularea creșterii și diferențierii limfocitelor B
Factorul H	Stimularea creșterii limfocitelor; inducerea eliberării factorului I din limfocite
C3a	Suprimă proliferarea limfocitelor indusă de antigen, producerea de anticorpi, citotoxicitatea mediată de limfocite T și NK
C3b în soluție	Inhibă proliferarea limfocitară indusă de antigene și mitogeni, producerea de limfokine
C3b imobilizat	Mediator al eliminării complexelor imune; localizarea antigenului în țesutul limfoid; fagocitoza complexelor imune; stimulează creșterea limfocitelor B; stimulează creșterea limfocitelor T dependente de IL-2; crește citoliza mediată de celulele K și NK; suport pentru prezentarea antigenului
iC3b	Mediator al fagocitozei; crește ADCC
C3d(g) în soluție	Inhibă creșterea limfocitelor B și T dependente de IL-2
C3d(g) inobilizat	Stimulează creșterea limfocitelor B
C5a	Crește proliferarea limfocitelor T induse antigenic și producția de anticorpi.

C5, în special C5b, are o mare afinitate pentru membranele celulare și este cel ce inițiază asamblarea complexului de atac ce cuprinde componentele C5 până la C9.

C3/C5-convertaza clasică sau alternă fixată pe o membrană scindează C5, cu condiția ca acesta din urmă să-i fie prezentat legat la o altă moleculă de C3b, în fracțiuni (2).

- C5a, dotat cu proprietăți de anafilatoxină și chimiotactism;
- C5b se fixează pe membrane biologice și interacționează cu stratul lor lipidic.

Fixarea C5b pe membrane biologice este urmată de legarea prin absorbție a C6 și C7 pentru a forma complexul stabil C5b, 6, 7. Acest complex trimolecular prezintă un situs labil de legare prin care se fixează solid pe o membrană celulară, servind ca sit de fixare pentru C8, formându-se astfel complexul C5b, 6, 7, 8. Această unitate are o anumită putere de dislocare a membranei și antrenează polimerizarea C9 (cel puțin 6 molecule de C9) (fig. XIII.12).

Complexul activat C5b-9 este extrem de stabil și se inseră în membranele celulare fosfolipidice (exemplu: eritrocite, limfocite, plachete, bacterii, virusuri sau alte celule normale sau tumorale) creând leziuni (vizibile în microscopia electronică) sub formă de tunel care traversează membrana, de 15 nm lungime și 10 nm diametru (2, 10, 29). Dislocarea membranei prin această structură are ca efect creșterea permeabilității membranei, permițând intrarea în celulă a apei și electroliților. Creșterea presiunii interne antrenează ulterior liza celulară (4, 10).

- Complexul litic poate să-și piardă activitatea hemoli-

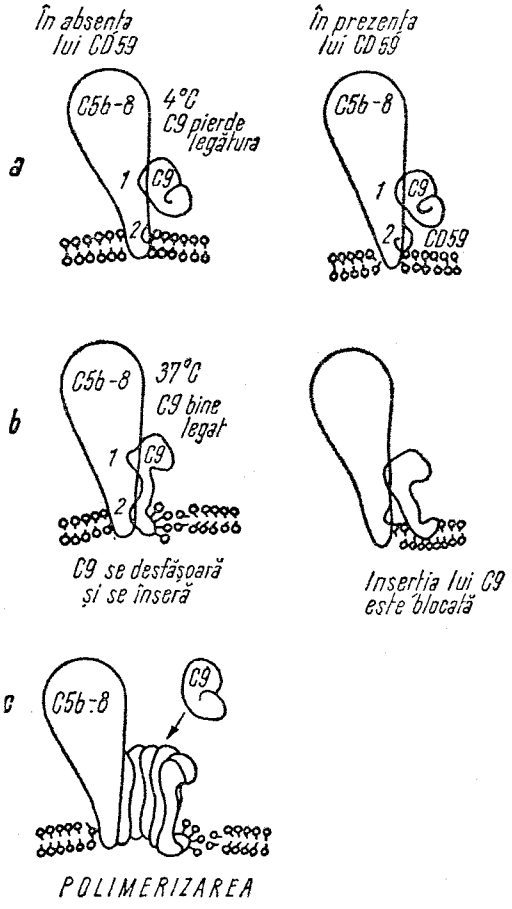


Fig. XIII.12. — Reprezentarea schematică a mecanismului propus pentru funcționarea proteinei CD59 (după Lachman).
b. La 37°C, C9 se desfășoară, interacționează cu al doilea situs C5b-8 și se integrează în membrane.
c. Polimerizarea lui C9 și formarea canalului transmembranar.
În prezența CD59, aceasta blochează situsul 2 pe C5b-8 și inhibă interacțiunea între C5b-8 și C9. Acțiunea citolică este blocată.

tică, sub acțiunea unui inhibitor plasmatic, *proteina S sau vitronectina* cu care se combină (2).

• În 1986, a fost izolată din eritrocitele umane o proteină de membrană *„homologous restriction factor"* (HRF) de 65 KDa care inhibă complexul litic, legând C8 (24).

• În 1988, Sugita și colaboratorii au descris o altă proteină de membrană (descoperită independent în mai multe laboratoare în același timp). *CD59 (HRF2O, MACIF, protectin)* este o proteină cu o masă moleculară de 20 KDa, prezentă pe un mare număr de celule în piele, ficat, rinichi, plămân, pancreas, glande salivare, placentă, sistem nervos central. CD59 leagă C8 și C9 inhibând acțiunea complexului litic. Modul de acțiune al acestei proteine este schematizat în fig. XIII.12 (24), dar distribuția sa atât de largă sugerează și alte activități încă neidentificate.

• În reglarea acțiunii complexului litic contribuie și proteina de membrană DAF (factorul de accelerare a degradării) descrisă mai sus.

• Deficiența celor 3 proteine de control conduce la hemoglobinurie paroxistică nocturnă (HPN) (14, 21, 30).

• Deficiența numai a proteinei DAF nu este cauză de HPN. Un singur caz cu deficit genetic de CD59 a fost descris. Acest bolnav a prezentat o HPN-*like* și accident vascular cerebral la vârstă tânără (36).

• Deficit izolat de HRF nu a fost descris.

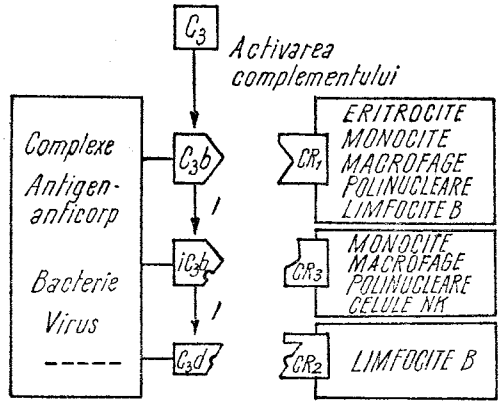


Fig. XIII.13. — Receptori celulari pentru fragmentele lui C3 (după Bach). Ligandul principal (C3b, iC3b, C3dg) rămâne legat covalent la particulele activatoare. Acestea devin capabile să interacționeze cu diferite tipuri celulare.

Receptori celulari pentru complement. Numeroase celule, în special cele care au de-a face cu microorganisme sau alți antigeni, prezintă pe membrana lor receptori pentru anumiți factori ai complementului: C1q, C4a, C4b, C3b, C3a, C3c, C3dg, C3d, iC3b, C5a. Principalele lor funcții sunt recunoașterea liganzilor și transducția semnalelor în celule, precum și inducția răspunsului celular, cum ar fi fagocitoza.

Cei mai importanți sunt însă receptorii de membrană pentru fragmentele derivate din C3 (tabelul 13.VII). Acești receptori pot fi evidențiați prin formarea de rozete „EAC" cu eritrocite acoperite de anticorpi IgM antieritrocitari și complement în concentrație nehemolitică. Aceștri receptori se găsesc pe majoritatea limfocitelor B, dar și pe monocite și polinucleare (ceea ce jenează în utilizarea lor drept markeri ai limfocitelor B). Receptorii pentru complement sunt glicoproteine de membrană. Structura și distribuția celulară și rolul lor sunt descrise în tabelul 13.VI și figura XIII.13 (1, 2, 9).

• *CR1 (CD35):* receptor pentru C3b (iC3b, C3c, C4b) şi proteină de membrană reglatoare. Este prezent pe: eritrocite, trombocite, polinucleare, neutrofile şi eozinofile, monocite, macrofage, limfocite B, limfocite TCD4+, celulele dendritice, foliculare, podocitele glomerulare.

TABELUL 13.VII

Receptori de membrană pentru C3
(după Anna Erdei)

Receptor	Ligand	Distribuţie celulară
C3aR	C3a (C4a)	Mastocite, monocite, macrofage, celule T, neutrofile, bazofile
CR1 (CD35)	C3b (IC3b, C3c, C4b)	Eritrocite, celule B şi T, monocite macrofage, celule dendritice foliculare, neutrofile, eozinofile
CR2 (CD21)	C3d, C3dg iC3b	Celule B, timocite, celule dendritice foliculare
CR3 (CD11b/CD18)	iC3b (C3d)	Monocite, macrofage, neutrofile, eozinofile, celule dendritice foliculare, celule K şi NK
CR4 (CD11c/CD18)	iC3b	Monocite, macrofage, neutrofile, celule K şi NK
CR5	C3dg, C3d	Neutrofile, trombocite

Receptorii CR1 permit:

— reglarea cascadei complementului prin fixarea C3b şi C4b, făcându-le astfel mai puţin disponibile;

— fenomenul de aderenţă imună şi opsonizare (aderenţa particulelor acoperite cu C3b la celulele fagocitare antrenând captarea particulelor);

— transportul complexelor imune de către eritrocite şi captarea lor de către celulele fagocitare din splină şi ficat;

— activarea limfocitară;

— reglarea convertazei alterne.

• *CR2 (CD21)* receptor pentru C3d, C3dg (iC3b) este prezent pe limfocitele B (unde joacă rol de receptor pentru virusul Epstein-Barr), pe unele limfocite TH şi pe celulele dendritice foliculare, jucând rol în răspunsul imun.

• *CR3 (CD11b/CD18)* receptor pentru iC3b (C3d) este prezent pe polinuclearele neutrofile şi eozinofile, monocite, macrofage, celule K şi NK, celulele foliculare dendritice.

Receptorul CR3 este format din 2 lanţuri: α şi β. Lanţul β este identic cu lanţul β al celor 3 proteine de adeziune leucocitară LFA-1, pl50, 95.

Lanţul α este propriu fiecărei proteine. Importanţa lor funcţională este atestată de gravitatea deficitului lor. Deficitul în CR3 este autosomal recesiv şi antrenează un deficit funcţional al adeziunii neutrofilelor, monocitelor şi limfocitelor. Deficitul este legat de un defect genetic al sintezei lanţului β (în timp ce lanţul α este normal). Deficitul în CR3 antrenează *in vitro* deficit al aderenţei, al fagocitozei, al chimiotactismului polinuclearelor. Limfocitele T au deficit al funcţiei citotoxice.

• *CR4 (CD11c/CD18)* receptor pentru iC3b este prezent pe polinucleare neutrofile, monocite, macrofage, celule K și NK. Ei au rol în:

— fenomenele de adeziune celulară;
— aderență, opsonizare;
— fagocitoza complexelor imune.

• *CR5* receptor pentru C3dg, C3d este prezent pe neutrofile și trombocite. CR5a induce marginația și chimiotactismul neutrofilelor și reglează expresia la suprafață a CR1 și CR3, recrutând astfel celulele fagocitare și făcându-le foarte active în fagocitoze. Eritrocitele primatelor exprimă CR1 și fixează complexele imune ce poartă fragmente C3 și/sau C4. Aceasta este o cale majoră de epurare a complexelor imune din sânge către mononuclearele fagocite din ficat și splină.

• *C3aR* receptor pentru C3a (C4a) este prezent pe neutrofile, bazofile, monocite, macrofage, mastocite, limfocite T.

CONSECINȚELE BIOLOGICE ALE ACTIVĂRII COMPLEMENTULUI

Activarea complementului antrenează formarea a numeroși produși cu activități biologice diverse.

Unii se depun la suprafața particulelor activatoare, antrenând liza acestora (complexul litic C5b-9) sau fagocitoza (C3b).

Alți produși: C3a și C5a antrenează o reacție inflamatorie locală.

Citoliza. Complementul antrenează liza diverselor tipuri de celule ca: eritrocite, leucocite, trombocite, bacterii, virusuri.

Unele celule, mai ales tumorale sunt rezistente la această liză, iar unele bacterii nu sunt lizate de complement decât în prezența altor factori (exemplu: lizozimul).

Aceste leziuni sunt exclusiv dependente de complexul litic activat $\overline{C5b\text{-}9}$ și necesită activarea tuturor componentelor complementului de la C1 la C9 pe oricare din căi (alternă sau clasică).

Interacțiuni celulare. *Interacțiuni cu celule fagocitare.* Neutrofilele, eozinofilele, monocitele și macrofagele (celule Kupffer și macrofage alveolare) au receptori CR1, CR3 și pentru fragmentul Fc al IgG1 și IgG3.

• Aderența și fagocitoza bacteriilor acoperite de IgG sunt favorizate de fixarea fracțiunii C3b; acesta este fenomenul de *imunoaderență* (2, 12, 25).

• Dar acestea pot să se producă și în absența complementului sau atunci când la suprafața bacteriilor (sau altor celule) se află numai C3b. Este fenomenul de *aderență opsonică.*

Rolul C3b în opsonizare este foarte important la începutul răspunsului imun primar, în prezența anticorpilor IgM neopsonizați (cea mai mare parte a celulelor efectoare nu prezintă receptori pentru IgM) (29). Ulterior, după apariția anticorpilor IgG, efectele opsonizante ale C3b sunt de mai mică importanță, pentru că legarea IgG la receptorii Fc ai celulelor fagocitare poate și singură să inducă fagocitoza.

De asemenea rolul C3b este important înaintea dezvoltării imunității specifice în cazul bacteriilor Gram-negative care activează direct calea alternă.

Importanța C3b în opsonizare este demonstrată prin gravitatea și frecvența infecțiilor la bolnavii cu deficit de C3 și CR3. Bolnavii cu deficit de CR3 prezintă: întârzierea căderii cordonului ombilical, infecții necrotice fără puroi (stomatite, infecții perirectale, enterocolite, pneumonii) și o granulocitoză persistentă.

Interacțiunile cu limfocitele. Limfocitele B au receptori CR1 și CR2 (distincți de receptorul pentru Fc și imunoglobulinele de membrană). Importanța acestor receptori limfocitari pentru complement, în special rolul lor modulator în răspunsul imun, este controversată, în raport cu rezultatele contradictorii obținute de diverși autori.

CR2 are rol în reglarea proliferării limfocitelor.

CR1 este exprimat la suprafața anumitor limfocite B și T.

CR1, CR3 și *CR4* sunt prezenți în celulele K. Țintele celulare cele mai variate, acoperite de slabe concentrații de anticorpi IgG (nu IgM și IgA), devin sensibile la efectul citotoxic al unor celule mononucleate, celulele K *(killer).* Este fenomenul *citotoxicității celulare dependentă de anticorpi* (ADCC — *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity).* Acoperirea cu C3b a celulelor țintă învelite cu IgG crește activitatea celulelor citotoxice (2).

Rolul proteinelor complementului în procesele imunologice este redat în tabelul 13.VI.

Interacțiunile cu eritrocitele. Eritrocitele prezintă receptorul *CR1* pentru C3b și C4b. CR1 eritrocitar, prin abundența sa, joacă rol important în *clearance*-ul complexelor imune. O slabă densitate a CR1 poate favoriza bolile prin complexe imune (exemplu: lupusul eritematos sistemic) (2, 26).

Prezența CR1 a fost demonstrată și la suprafața celulelor podocitare glomerulare. Rolul său este încă necunoscut.

Eritrocitele sunt folosite ca indicator, pentru detectarea, prin hemaglutinare, a prezenței C3b sau C4b la suprafața diverselor particule.

Interacțiunea cu complexele antigen-anticorp se exprimă diferit în funcție de natura antigenului: hemoliză imună, citoliză imună, bacterioliză, fixarea complementului. Recent a fost descrisă o glicoproteină serică (gp60) cu masa 60 kDa care poate regla interacțiunea C — complexe imune prin inhibarea legării C1q cu Fc. Prezentă pe majoritatea limfocitelor B și pe mai puține limfocite T și celule NK, această proteină este considerată ca un nou tip de receptor Fc. Aderența imună a complexelor antigen-anticorp de celulele nesensibilizate (de exemplu eritrocite) este mediată prin C4b sau C3b. Acest mecanism se crede că este important în *clearance*-ul complexelor imune.

Rolul în inflamație. Numeroși produși de activare ai componentelor complementului pot provoca sau amplifica procesele inflamatorii. Cele mai studiate componente și cu cea mai intensă acțiune proinflamatorie sunt: C3a și C5a.

Anafilatoxinele C3a și C5a. Ambele anafilatoxine au proprietăți comune. Ele derivă prin clivaj din precursorii lor C3 și C5 la extremitatea N-terminală a lanțurilor α. Au o greutate moleculară asemănătoare

de ~10 KDa și sunt compuse din 77 și respectiv 74 de acizi aminați, a căror secvență prezintă asemănări. Cele 2 peptide posedă în poziția carboxi-terminală o arginină care este esențială în activitatea lor biologică (responsabilă de proprietățile contractile).

Au fost denumite astfel datorită răspunsului asemănător cu anafilaxia pe care-l produc când sunt injectate la animale.

Anafilatoxinele provoacă eliberarea de histamină de către mastocite și bazofile și contracția mușchilor netezi în numeroase organe. Împreună ele contribuie la recrutarea și dirijarea elementelor moleculare și celulare de apărare ale gazdei către țesuturile invadate de agenți patogeni.

Injectate intradermic, ele antrenează eritem, edem localizat și apariția de celule de inflamație.

Există însă și diferențe între cele 2 peptide.

C5a este de până la 200 de ori mai activ decât C3a.

C5a (și nu C3a) are efect chimiotactic pe:

- polinucleare, antrenând marginația lor în vase și neutropenie sanguină:
- activează neutrofilele, le crește adezivitatea și antrenează liberarea de enzime lizosomale. El stimulează intens metabolismul oxidativ al neutrofilelor cu liberarea de radicali oxizi toxici. Efectele sale sunt prezente la concentrații sub 10^{-10} μ.

Receptorii celulari pentru C3a și C5a diferă și ei. Cei pentru C5a sunt mai bine caracterizați și s-au făcut progrese mari în clonarea și secvențarea lor.

Anafilatoxinele sunt inactivate de carboxipeptidaza B serică care liberează arginina terminală. C3a care a pierdut arginina pierde toate activitățile biologice, spre deosebire de C5a care pierde numai activitatea pe mușchii netezi, dar păstrează activitatea chimiotactică.

Alte fragmente active (cu rol în inflamație). În afară de anafilatoxine, există și alte fragmente ale complementului cu activități biologice:

- fragmentul Bb induce etalarea macrofagelor;
- fragmentul Ba are efect chimiotactic;
- C2-kinina (fragment al lui C2) crește permeabilitatea vasculară;
- C3e, un fragment de degradare al lui C3c, crește nivelul leucocitelor circulante prin mobilizarea rezervelor medulare;
- C4a atașată și anafilatoxinelor antrenează eliberarea, în mai mică măsură, de histamină din bazofile și mastocite (18);
- C5a și alte produse ale activării C provoacă liberarea de factor activator plachetar din diverse celule, care are un efect puternic asupra metabolismului acidului arahidonic pe ambele sale căi (lipooxigenaza și ciclooxigenaza).

Alte activități biologice ale complementului. Complementul posedă și alte activități, a căror importanță este încă dificil de apreciat.

- Activarea C1, C4, C2 neutralizează unele virusuri.
- Există interrelații între sistemul complementului și cele ale coagulării, fibrinolizei și kininelor:

— plasmina activează C1s și C3;

— C1-INH inhibă nu numai C1r și C1s, dar și factorul XI activat, kalicreina și plasmina;

— factorul H și fragmente din C3 și C5 stimulează generarea și eliberarea de metaboliți ai acidului arahidonic.

CONTROLUL ȘI REGLAREA ACTIVĂRII COMPLEMENTULUI

Activarea complementului induce activități efectoare intense împotriva agenților patogeni (liza de celule și particule, osponizarea pentru fagocitoză, activitatea anafilactică), dar potențial agresive pentru celulele proprii, ale gazdei, care sunt însă protejate prin factori de restricție omologi, inhibitori sau inactivatori. Acești factori sunt proteine glicolipidice, cele mai multe fixate pe membrana celulară. Unii din ei, cum sunt C4bp, DF, H, complexul de atac al membranei, CR1 și CR2, reglează rata de formare și activitatea convertazelor celor două căi, clasică și alternă de activare. Alții, cum sunt proteina S plasmatică (vitronectina), proteinele de membrană HRF *(homologous restriction factor),* CD59 (protectina) și DAF (factorul de accelerare a degradării), reglează inhibând activitatea complexului de atac al membranei. Pe de altă parte, C3a/C5a INA o carbopeptidază, inactivează efectul agresiv al anafilatoxinelor C3a și C5a.

Prin acțiunile lor intricate cu cele ale componentelor active ce se formează în cascada de activare a complementului, factorii de restricție inhibitori sau inactivatori asigură o desfășurare a activităților de atac împotriva agenților patogeni, protejând celulele și țesuturile gazdei de agresiuni potențiale din partea unor componente ale complementului.

ROLUL COMPLEMENTULUI ÎN PATOLOGIE

În vascularitate. Activarea complementului prin complexele imune depuse în țesuturi participă la leziunile de vascularită (reacție de hipersensibilitate prin complexele imune).

În procesele citolitice. Activarea complementului prin anticorpii fixați pe un antigen celular poate conduce la liza celulelor (hemoliza intravasculară).

În reacțiile anafilactice. O activare masivă a complementului (sub influența unor substanțe sau medicamente) conduce la reacții generale produse de la prima injecție.

EXPLORAREA SISTEMULUI COMPLEMENT

Componentele complementului pot fi studiate:

- *global* prin dozaj hemolitic;
- *analitic* prin dozarea diferitelor componente ale complementului cu ajutorul imunodifuziei radiale simple tip Mancini, a imunoelectroforezei, electroforezei bidimensionale Laurell, imunofluorescenței și testului indirect cu antiglobulină umană utilizând un reactiv cu activitate anti-

complement, aglutinare în gel, anticorpi monoclonali, *flow*-citometria (16, 27, 28).

Prelevare și conservare. Studiul sistemului complement este făcut pe ser. Sângele este prelevat fără anticoagulant, iar coagularea se realizează la temperatura camerei în cel mult 3 ore după prelevare.

Componentele complementului sunt substanțe termolabile. Conservarea la 37°C, la temperatura camerei sau la 4°C produce alterări puțin marcate ale activității complementului.

Conservarea serului la —20°C până la —70°C păstrează activitatea complementului pentru o perioadă de una până la două luni.

Cea mai bună sursă de complement este serul proaspăt de până la 48 de ore.

Metode de explorare. Complementul este obișnuit măsurat, evaluând capacitatea serului de a liza eritrocite de berbec acoperite cu anticorpi de iepure anti-eritrocite de berbec. Sunt dozate astfel componentele *căii clasice.* Valorile sunt exprimat în unități pe ml. Unitatea CH50 definește cantitatea de ser necesară pentru a liza 50% din eritrocite.

Activitatea globală a *căii alterne* poate fi apreciată prin AP50, evaluând capacitatea serului de a liza eritrocite de iepure (care activează direct calea alternă la om) (fig. XIII.14) (2).

Dozarea cantitativă este realizată de rutină pentru C1q, C3, C4 prin imunodifuzie radială simplă. Valorile pentru CH50 sunt variabile de la un laborator la altul și trebuie interpretate în funcție de rezultatele normale furnizate de laborator.

Valorile normale măsurate prin dozare cantitativă pentru fiecare component sunt prezentate în tabelul 13.I.

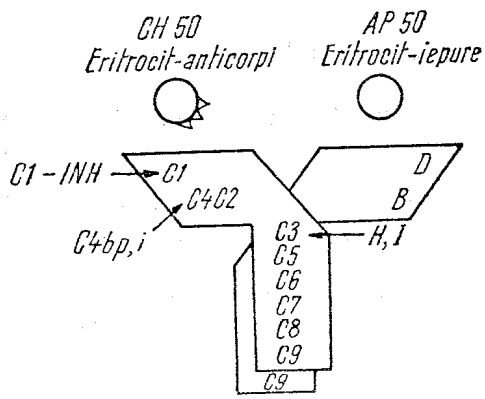


Fig. XIII.14. — Măsurarea activității funcției globale a căii clasice și a căii alterne a complementului.

Determinarea volumului de ser uman lizând 50% eritrocite (Er) constituie măsura complementului hemolitic total. Utilizarea Er de berbec acoperite cu Atc. IgM de capră antiberbec care activează calea clasică, permit măsurarea globală a activității acestei căi. Utilizarea Er de iepure nemodificate, activatori naturali ai căii alterne umane, permit măsurarea globală a activității căii alterne.

• Creșterea complementului se observă în cursul diverselor afecțiuni inflamatorii sau infecțioase: reumatism articular acut, artrită reumatoidă, periarterită nodoasă, dermatomiozită, tiroidită, infarct miocardic sau cancere, limfoame.

• Deficitele genetice sau dobândite ale unor componente ale complementului sunt asociate, unele cu afectarea mecanismului de apărare față de agenți patogeni ca streptococi, stafilococi, Neisseria (meningococi, gonococi), având ca urmare o tendință crescută la infecții, uneori grave,

cu asemenea germeni, iar altele cu scăderea protecției contra dezvoltării bolilor prin complexe imune (LED) sau cu alte boli (vezi capitolul Deficitele sistemului complement).

• În cursul hemodializei are loc o creștere a expresiei receptorului CR3 pe granulocite, fapt care a fost pus în legătură cu o sechestrare a lor în circulația pulmonară care ar duce la o scădere a funcției pulmonare.

Aplicări în terapeutică. Sistemul complement având un rol major în inflamație, influențarea în sensul activării sau inhibării componentelor sale, poate avea un efect favorabil, reducând intensitatea leziunilor tisulare din bolile inflamatorii. Pe această linie, unele cercetări au condus la producerea unui inhibitor endogen al sistemului complement, care a și fost preparat prin tehnologia recombinantă a ADN în cantități suficiente pentru aplicare terapeutică în scopul reducerii sau suprimării procesului inflamator. Preparatul de CR1 solubil uman, realizat recent, s-a dovedit a avea o acțiune inhibitoare a C3 și C5 convertazei din ambele căi, clasică și alternă, de activare, și deocamdată administrat i.v. la șoareci cu modele de leziuni miocardice postischemice sau de vascularită prin complexe imune, a diminuat net leziunile tisulare (22).

BIBLIOGRAFIE

1. ASSIM: Immunologie générale. Medsi-McGraw-Hill, 1991, 109—122.
2. BACH J. F., LESAVRE PH.: Immunologie. Edit. Flammarion, Paris, 1989, 103—115.
3. BERCEANU ȘT., PĂUNESCU E.: Biologia și patologia imunității, Edit. Acad. R.S.R., București, 1981, 90—100.
4. BHAKDI SUCHARIT, TRANUM-JENSEN JORGEN: Immunol. to Day 1991; 9: 318.
5. BROWN D., WANECK G. L.: Amer. Soc. Nephrol. 1992; 3 (4): 895.
6. COLIȚĂ D.: Introducere în Imunologie. Edit. Medicală, București, 1993, 10—12.
7. COOPER NEIL R.: Immunol. to Day 1991; 12 (9): 327.
8. EISEN H. N.: Immunology. Harper & Row, New York, 1980.
9. ERDEI ANNA, FÜST G., GERGELY J.: Immunol. to Day 1991; 9: 332.
10. ESSER A.: Immunol. to Day 1991; 9: 316.
11. FARRIES T., ATKINSON J. P.: Immunol. to Day 1991; 9: 295.
12. FRANK M., FRIES F. L.: Immunol. to Day 1991; 9: 322.
13. FUDENBERG H. H., STITES D. P. și colab.: Basic and Clinical Immunology. Lange Med. Publ., New York, 1980.
14. FUJIOKA S., YAMADA T.: Brit. J. Haematol. 1993; 83: 660.
15. GARRATTY G., FIMLS, PATH M. R. C.: Human Pathology, 1983, 14: 204.
16. GUIMBRETIÈRE L., BERNARD D. și colab.: Presse méd. 1993; 22: 467.
17. HABIBI B.: Sem. Hôpit. 1989; 65: 1465.
18. HARRISON S.: Principles of internal medicine (ed. a 12-a). McGraw-Hill/Interamericana de Espana, 1991.
19. IRVINE J. W.: Medical Immunology. Teviot Scient. Publ., Edinburgh, 1979.
20. KAHN M. F., PELTIER A. P.: Maladies dites systémiques. Edit. Flammarion, Paris, 1982.
21. KAWAKITA M., TOMITA M., TAKATSUKI K.: Amer. J. Haematol. 1993; 43: 14.
22. KINOSHITA TAROH: Immunol. to Day 1991; 12: 291.
23. KOFFLER D.: Clinical Symposia 1987; 39: 2.
24. LACHMANN P. J.: Immunol. to Day 1991; 12: 312.
25. LAFONTAINE M., LEBRUN S.: Immuno-Hématologie. Decarie. Montréal; Maloine, Paris, 1985; 23—29.
26. MORGAN PAUL B., WALPORT MAR K. J.: Immunol. to Day 1991; 12: 301.
27. NAVENOT J. M. și colab.: Rev. fr. Transf. Hémo-Biol. 1993; 36: 135.

28. NILSSON B. şi colab.: Vox Sang. 1993; 6, 4, 1: 43.
29. ROITT M., BROSTOFF J., MALE D. K.: Immunologie fondamentale et appliquée. Medsi/McGraw-Hill, Paris, 1989.
30. ROTOLI B. şi colab.: Blood Rev. 1993; 7: 75.
31. SIM R. B., REID K. B. M.: Immunol. to Day 1991; 12: 307.
32. SIMS P. J., WIEDMER THERESE: Immunol. to Day 1991; 12: 338.
33. TISSOT J. D., GROB J. PH., SCHNEIDER PH.: Méd. Hyg. 1990; 48: 834.
34. WHITLOW M. şi colab.: Blood 1993; 81: 510.
35. WIEDMER T. şi colab.: Blood 1993; 82: 1192.
36. YAMASHINA M. şi colab.: N. Engl. J. Med. 1990; 323: 1184.

XIV

HOMEOSTAZIA HEMOSTAZEI

C. POPPA, FLORICA ENACHE

Sângele suferă *in vitro* două modificări fizice a căror secvență este următoarea: mai întâi trece repede în stare solidă, ca efect al coagulării sale; apoi se relichefiază lent, ca efect al fibrinolizei (6).

Concepțiile asupra acestor două fenomene au evoluat în decursul timpului, restructurându-se și amplificându-se în raport cu datele noi ale cercetărilor întreprinse în acest domeniu.

În vechea schemă clasică a coagulării sângelui (1950) existau cinci etape ale desfășurării acestui mecanism complex: generarea tromboplastinei, generarea trombinei, transformarea fibrinogenului în fibrină, retracția cheagului, fibrinoliza. Se considera că această ultimă fază întregește ciclul, readucând sângele în aceeași stare fizică (lichidă) în care se afla la început (51).

Rezultatele cercetărilor din ultimii ani au modificat această schemă, detașând din conținutul ei fibrinoliza, care a devenit un fenomen independent, cu un mecanism propriu destul de complex (31). În prezent, hemostaza și fibrinoliza sunt privite ca două sisteme fiziologice ale sângelui care funcționează în strânsă legătură, însă în competiție antagonistă, primul fiind cel care produce cheagul cruoric, iar al doilea cel ce îl lizează (23, 25). Din echilibrul armonios al activităților lor rezultă, pe de o parte, fluiditatea sângelui, pe de alta, păstrarea permanentă a potențialului său hemostatic (57, 62). Ori de câte ori se produce o dereglare a acestui echilibru biologic, apar manifestări caracteristice, provocate de schimbarea fluidității sângelui: solidificarea sa, atunci când o breșă în sistemul vascular îl pierde în afară; relichefierea sa, atunci când un obstacol trombotic se opune liberei sale circulații în vase (44). Este vorba de un sistem complex de autoreglare și autoapărare, pe care sângele îl pune în acțiune atunci când este nevoie și ale căror două mecanisme sunt antagoniste, deși interdependente (fig. XIV.1).

Hemostaza și fibrinoliza reprezintă de fapt un aspect disociat al unei funcții sanguine unice, pe care autorii anglo-saxoni o numesc „homeo-

stazia hemostazei", iar cei latini „echilibrul fluidocoagulant" sau „funcția coagulolitică". Echilibrul dintre ele realizează starea fiziologică fluidă a sângelui, păstrându-i permanent capacitatea de a coagula. Balanța între aceste două activități nu este însă de o fixitate absolută și rigidă. Ea realizează un echilibru dinamic permanent, în cadrul căruia dereglările se pot face într-unul din sensuri, cu o amplitudine infimă și insesizabilă și pentru o durată scurtă de timp, revenirea la normal făcându-se întot-

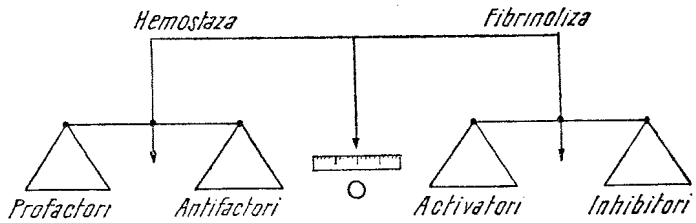


Fig. XIV.1. — Echilibrul homeostatic al hemostazei.

deauna prin mărirea activității funcției antagoniste (62). Aceste dereglări sunt fiziologice și utile economiei biologice a organismului. Când dereglările sunt însă de mare amplitudine, cu repercutare generală și pentru durată mare de timp, ele intră în cadrul patologiei și se pot manifesta ca sindrom tromboembolic, sindrom fibrinolitic și sindroame hemoragice (13).

HEMOSTAZA

Hemostaza fiziologică este procesul care asigură oprirea hemoragiilor ce apar ca urmare a unei efracții a peretelui capilar.

Hemostaza fiziologică are două atribute specifice: este efectivă numai *in vivo* și nu este implicată decât în hemoragiile vaselor foarte mici, neavând contingență cu hemostaza chirurgicală (16).

Hemostaza fiziologică cuprinde un ansamblu de fenomene fizice, chimice și biologice, la care participă numeroși factori: celulari, tisulari, vasculari și umorali; ea reprezintă rezultanta coroborării a trei mecanisme fundamentale: vascular, plachetar și plasmatic.

În desfășurarea cronologică a oricărui proces hemostatic, se disting doi timpi principali, și anume: timpul vasculoplachetar (primar, provizoriu sau parietal) și timpul plasmatic (secundar, definitiv, coagularea) (fig. XIV.2) (16, 23).

a) **Timpul vasculoplachetar** reprezintă un ansamblu de reacții prompte, al căror efect clinic este oprirea provizorie a sângerării; din punct de vedere biologic, el permite realizarea condițiilor necesare formării cheagului cruoric, în timpul plasmatic.

Această fază are în contextul său două momente, care se succed: 1) timpul vascular, în care se realizează o vasoconstricție reflexă în teritoriul afectat și 2) timpul plachetar, în care se realizează formarea trombusului plachetar, care colmatează breșa vasculară.

b) **Timpul plasmatic** reprezintă continuarea și amplificarea acțiunilor începute în timpul anterior. Hemostaza primară având un caracter provizoriu, nu ar fi niciodată capabilă să rezolve singură o hemoragie, dacă nu ar fi urmată de hemostaza secundară, cea definitivă, realizată în cadrul timpului plasmatic, în care are loc coagularea, etapa cea mai importantă, în care se construiește cheagul sanguin. Aceasta are în contextul ei două căi de acțiune (extrinsecă și intrinsecă) și se desfășoară în patru momente, a căror succesiune este următoarea: 1) generarea protrombina-

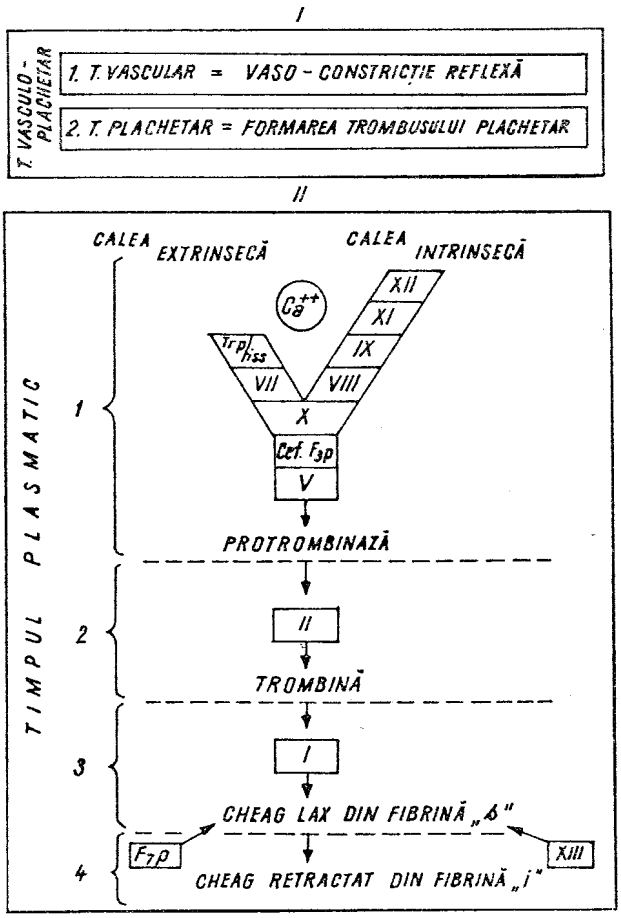


Fig. XIV.2. — Hemostaza (privire sintetică).

zei, 2) generarea trombinei, 3) transformarea fibrinogenului în fibrină cu stabilizarea fibrinei, 4) sinereza și retracția cheagului.

La desfășurarea procesului hemostatic concură trei mecanisme, aparent în succesiune cronologică, dar de fapt destul de intricate: vascular, plachetar și plasmatic.

A. **Mecanismul vascular.** Înainte de a aborda mecanismul de reacție al capilarului la o leziune, este utilă o descriere succintă a arhitectonicii sale normale și a perturbărilor ce le produce leziunea asupra ei (fig. XIV.3).

Capilarul are un perete constituit dintr-un singur strat de celule endoteliale plate, așezate pe o membrană bazală, suportată de țesutul conjunctiv pericapilar de susținere, bogat în fibre de colagen. Celulele endoteliale sunt solidarizate între ele de un ciment interendotelial (chit-substanță), care umple spațiile interendoteliale. Către lumenul vasului, celulele sunt protejate de un film sau peliculă de fibrină, care se consumă și se reînnoiește continuu. În fine, pe toată suprafața internă a capilarului se află adsorbit un strat fin (2 μ) de plasmă, cu circulație foarte

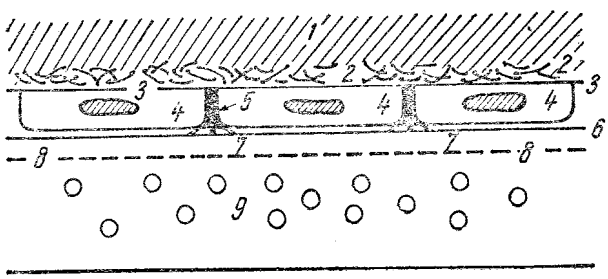


Fig. XIV.3. — Structura capilarului:
1: țesut de susținere pericapilar; 2: fibre de colagen; 3: membrana bazală; 4: celule endoteliale (plate); 5: spațiul interendotelial ocupat de cimentul intercelular (chit); 6: pelicula de fibrină protectoare; 7: atmosferă plasmatică endotelială; 8: limita atmosferei plasmatice endoteliale; 9: plachete circulante.

lentă, care formează atmosfera endotelială (41). Integritatea peretelui capilar este influențată pozitiv de: glucocorticoizi, estrogeni conjugați, bioflavonoizi, vitamina C, și negativ de: trombopenie, stres și adrenohormoni. Leziunea peretelui capilar tulbură această arhitectură. Celulele endoteliale se descuamează, bazala lor se rupe și sunt lăsate descoperite zone de țesut de susținere bogat în fibre de colagen. Această leziune perturbă profund echilibrul hemostatic din zona respectivă.

Mecanismul vascular este primul care intră în acțiune, fiind declanșat de leziunea locală a peretelui capilar (indiferent de natura acesteia). Este un fapt verificat experimental, că orice vas lezat își diminuează calibrul. Proprioceptorii din zona leziunii sunt excitați, ceea ce are ca răspuns o vasoconstricție locală, indusă fie prin reflex axonic, fie pe calea unui arc reflex (71). La vasoconstricție participă și un factor EDCF *(endothelium derived contracting factor),* eliberat de endoteliu, împreună cu un peptid, endotelina, recent identificat (79). Scopul vasoconstricției este multiplu: în primul rând reducerea la nivelul leziunii a debitului sanguin, deci a pierderii de sânge; în al doilea rând, staza sanguină, efect hemodinamic al vasoconstricției, permite plachetelor din circulație să margineze (să treacă din mijlocul șuvoiului sanguin către periferia sa, adică de la viteza de 4 cm/s la 5 mm/s); și, în fine, vasoconstricția permite reacțiilor enzimatice locale să se dezvolte.

B. **Mecanismul plachetar.** Plachetele reprezintă factorul celular al hemostazei. Importanța lor în acest domeniu este invers proporțională cu talia lor, ceea ce a făcut să fie supranumite „pitici ai circulației, giganți ai hemostazei" (1, 74).

Mecanismul plachetar intră în acțiune în momentul imediat următor marginației plachetelor. Se știe că endoteliul vascular intact (normal)

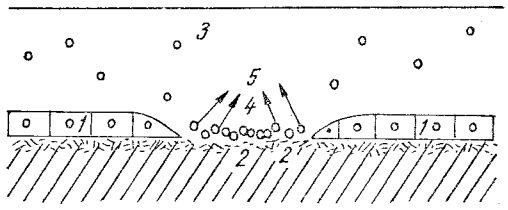
nu este umectabil, ceea ce îl face să aibă față de plachete un comportament asemănător cu suprafețele hidrofuge (silicon, plastic, arquad etc.), adică de neadezivitate. Dar zonele de colagen subiacente endoteliului lezat nu posedă proprietăți hidrofuge; ele sunt umectabile și de fibrele lor de colagen aderă imediat plachetele marginate, acoperind locul cu un veritabil tapet plachetar (fig. XIV.4).

Colagenul, proteină fibrilară a țesutului conjunctiv, sintetizată de fibroblaști, este constituit din 3 lanțuri helicoidale legate între ele prin covalențe și punți de hidrogen; conține multă oxiprolină și prezintă diverse grade de polimerizare, legate de nivelul său de maturație. S-a constatat că, cu cât maturarea este mai avansată, cu atât aderarea plachetelor este mai rapidă și mai amplă.

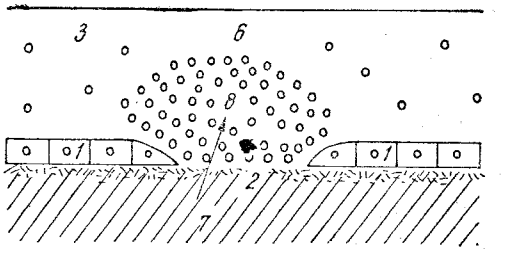
Fiind constituit din lanțuri polipeptidice, colagenul are libere atât grupări aminice, cât și grupări carboxil. Primele sunt implicate în aderarea plachetelor (blocarea lor anulează aderarea); celelalte sunt implicate în activarea F XII plasmatic (blocarea lor anulează activarea). Tratarea moleculei de colagen cu colagenază (care-i distruge structura) face să-i dispară aceste proprietăți (12).

Aderarea plachetelor la colagen, fenomen extrem de rapid, necesită prezența proteinei plasmatice denumite „fracțiunea von Willebrand a F VIII al coagulării" (F VIII-vW).

Mecanismul intim al aderării este astăzi bine cunoscut. Inițial are loc un fenomen electrostatic de cuplare, în cadrul căruia plachetele (încărcate negativ, —60 mV, grație bogăției membranei lor în acid N-acetil-neuraminic), aderă la încărcăturile pozitive ale grupelor aminice din molecula de colagen (14, 19). Apoi urmează un fenomen chimico-enzimatic, care constă în formarea a 2 punți: una, între situsurile pentru



1. Endoteliu intact. 2. Descuamare endotelială lezională cu dezgolirea colagenului. 3. Plachete circulante 4. Plachete aderate la colagenul leziunii (tapetul plachetar). 5. Agreganți liberați din pl. adesive.



6. Pl. agregate reversibil formînd trombul plachetar lax.
7. Eliberarea de T.R.P.L. TISS. din țesutul lezat.
8. Trombina formată pe calea extrinsecă.
9. Pl. agregate ireversibil formînd trombul pl. ferm.

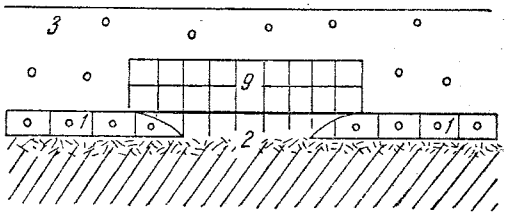


Fig. XIV.4. — Fazele timpului vasculoplachetar al hemostazei.

F VIII-vW de pe membrana plachetară din glicoproteina I şi cel pentru plachetă de pe molecula de F VIII-vW; iar a doua punte între situsul pentru F VIII-vW de pe molecula de colagen şi cel pentru colagen de pe molecula de F VIII-vW (26, 27) (fig. XIV.5). Ambele cuplări sunt realizate de glucozil transferază.

Ca urmare a aderării, plachetele îşi măresc volumul (cu cca 25%), fenomen denumit *swelling* (tumefiere) şi suferă modificări metabolice importante. Este mai întâi activată fosfolipaza A_2, din echipamentul enzimatic al membranei plachetare, a cărei activitate transformă acidul linolenic (difuzat din plasmă şi fixat în membrana plachetară), în acid arahidonic (eicosatetraenoic). Ciclooxigenaza plachetară îl converteşte în doi endoperoxizi: PGG_2 şi PGH_2 pe care prostaglandin sintetaza îi transformă în 2 prostaglandine: PGE_2, PGF_2, iar tromboxan sintetaza în tromboxan A_2 (TxA_2) (67); toate aceste substanţe excită sistemul contractil al plachetei. Efectul este o contracţie internă, care are ca urmare expulzarea în exterior a: Ca^{++} din combinaţia lui în calmodulină, prostaglandinelor, tromboxanului, granulelor dense (delta) care conţin ADP şi serotonină şi a granulelor clare mici (alfa) care conţin F_4 plachetar şi β-tromboglobulină (39). Fenomenul se numeşte „eliberarea I" (*release* I) (fig. XIV.6).

El se produce prin sistemul microtubulilor, păstrându-se integritatea plachetei. ADP, prostaglandinele şi tromboxanul induc agregarea plachetelor aderate. De acestea se prind, sub influenţa agreganţilor amintiţi, noi straturi de plachete, într-o suprapunere treptată, autoîntreţinută, fenomenul luând sfârşit prin transformarea tapetului plachetar într-un veritabil roi (ciorchine) de plachete agregate, care colmatează breşa vasculară. Acesta este trombusul plachetar lax, denumire nouă, care înlocuieşte pe cea de „cui plachetar", iar fenomenul în baza căruia a luat naştere se numeşte agregare reversibilă. Îndată după aceasta, TxA_2 trece în forma sa inactivă TxB_2.

Factorul 4, eliberat tot în cursul „eliberării I", este o antiheparină şi are rolul de a neutraliza la nivel local acţiunea anticoagulantă a heparinei fiziologice. Beta-tromboglobulina este inhibitorul prostaciclinei, antiagregant eliberat de endoteliu (vezi fig. XIV.6). Factorul 5 este serotonina, al cărei rol este de a prelua ştafeta vasoconstricţiei reflexe, înlocuind-o în continuare cu vasoconstricţia chimică (altminteri ar exista riscul desprinderii trombusului plachetar, prin spălarea lui de către curentul de sânge, de îndată ce vasoconstricţia reflexă ar înceta). Calmodulina, activator al kinazei actomiozinei, liberează Ca ionic din combinaţia lui inactivă şi stabilă în microtubulii citoplasmei plachetare.

Leziunea nu se limitează numai la capilar, ci interesează şi zona pericapilară. Ca urmare, din celulele lezate se eliberează o cantitate mică de tromboplastină, care — difuzând în trombusul plachetar lax — întâlneşte o atmosferă locală foarte propice reacţiilor enzimatice de coagulare. Aceasta are loc pe calea extrinsecă (vezi fig. XIV.2), şi efectul ei este producerea unei mici cantităţi de trombină, a cărei acţiune se exercită asupra plachetelor din trombus. Ca urmare, începe un proces specific plachetelor, şi anume un proces de hiperpermeabilizare şi fragmentare a membranelor; acesta este urmat de golirea cromomerului prin expulzarea în exterior a granulaţiilor sale clare şi lizosomale, ca o consecinţă a unei

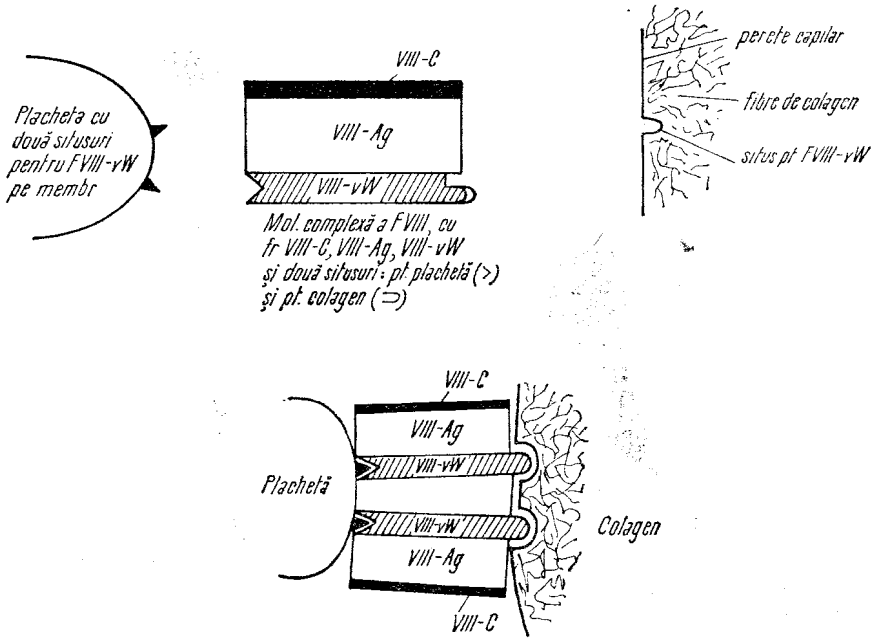


Fig. XIV.5. — Fenomenul de aderare plachetară la locul leziunii capilarului.

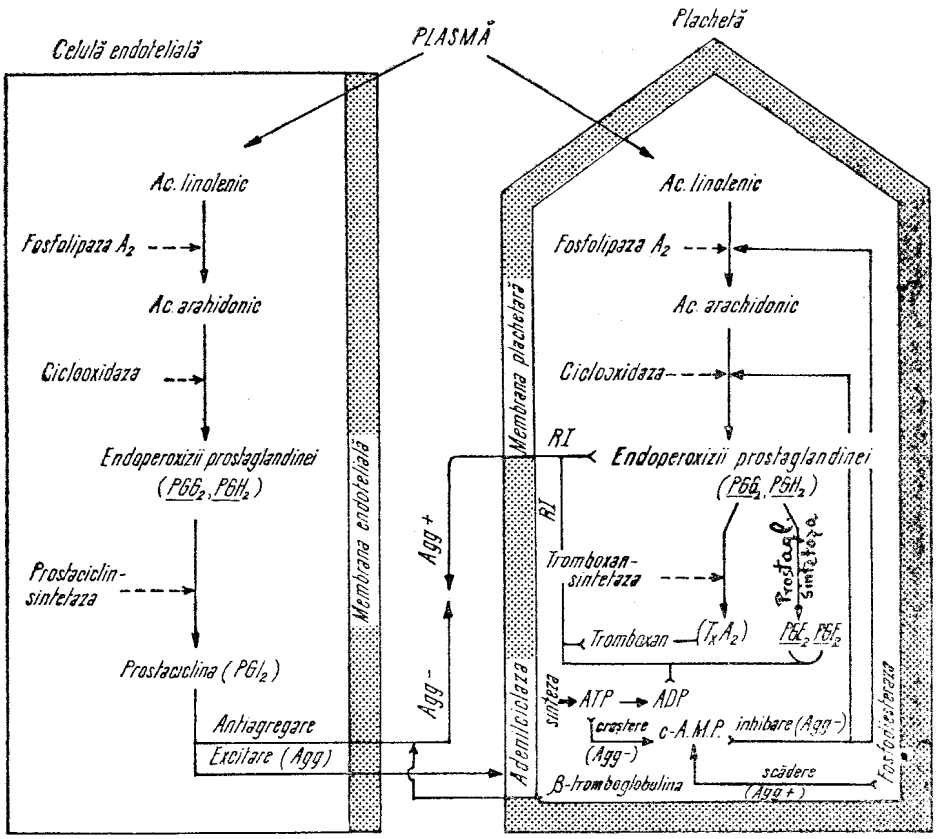


Fig. XIV.6. — Mecanismul metabolic al agregării plachetare și echilibrul său.

contracţii interne cauzată de mari şi ireversibile modificări metabolice ce duc în final la distrugerea plachetelor. Fenomenul poartă numele de „eliberarea II" *(release II)* şi se petrece în trei timpi: a) hiperpermeabilizarea membranelor prin acţiunea trombinei; b) pătrunderea Ca^{++} plasmatic în plachete şi activarea ATPazei; c) contracţia trombosteninei sub influenţa calmodulinei şi a liberării de energie din molecula de ATP (clivată de ATPază). Urmarea acestei contracţii interne este expulzarea granulaţiilor cromomerului şi eliberarea trombosteninei, care în exterior realizează prin contracţie externă fenomenul de retracţie a cheagului.

Consecutiv expulzării granulaţiilor cromomerului, este pus în libertate conţinutul enzimatic, constituit din următorii factori plachetari: F_{p1}, F_{p2}, F_{p3}, F_{p6}, F_{p7}, F_{p8} şi F_{p9}, indispensabili procesului de coagulare a plasmei sanguine. Se mai eliberează de asemenea din trombocit: ATIII, α_2-

TABELUL 14.I

Factorii plachetari

Nr. din nomenclator	Funcţia pe care o îndeplineşte
Fp 1	Participă la conversiunea protrombinei în trombină (F.V.)
Fp 2	Participă la transformarea fibrinogenului în fibrină
Fp 3	Fosfolipoidul plachetar (PTF) participă la formarea protrombinazei
Fp 4	Antiheparina
Fp 5	Serotonina (5HT)
Fp 6	Fibrinogenul plachetar
Fp 7	Trombostenina, efectuează retracţia cheagului
Fp 8	Antifibrinolizina plachetară (antiplasmină de tip α_2)
Fp 9	Factorul stabilizant al fibrinei (identic cu subunitatea „a" a (FXIII!) plasmatic
FXI	Identic cu cel plasmatic — se activează prin fenomenul de *release*
AT II şi AT III	Antitrombine pentru ţinerea sub control a coagulării
Agenţi LASS*	(ADP Prostaglandine şi Tromboxan). Efectuează agregarea plachetară
β-tromboglobulină	Inhibă prostaciclină endotelială (PGI_2)
Trombospondină	Transformă agregarea reversibilă în ireversibilă
Calmodulin	Activator al kinazei Fp7 şi combinaţie stabilă a Ca intracitoplasmatic
$PGF_{1 şi 2}$	*(Platelet growth factor)* Stimulează creşterea fibrelor musculare netede
PSF	*(Permeability stimulation factor)* Stimulează permeabilitatea capilară

* LASS=*Labile aggregating stimulation substances.*

macroglobulină, trombospondină (care transformă agregarea reversibilă în ireversibilă și trombusul plachetar lax în ferm), FXI și doi factori de stimulare a creșterii fibrelor musculare netede ($PGF_{1,2}$=*platelet growth factor* 1 și 2), ca și factorul de stimulare a permeabilității capilare (PSF). Tabelul 14.I înfățișează echipamentul plachetar în factori ai hemostazei, iar figura XIV.7 schematizează întregul mecanism al hemostazei detaliind faza ei primară.

C. **Mecanismul plasmatic** încheie și definitivează acțiunile celorlalte două mecanisme, cărora le succede, dar cu care se intrică în parte, realizând hemostaza permanentă prin formarea gelului de fibrină, a cărui rețea constituie structura cheagului. Mecanismului plasmatic al hemostazei i s-a dat denumirea de „coagulare".

Coagularea poate fi definită ca o modificare a stării fizice a sângelui, care trece din stare lichidă în stare de gel (cheagul). Această transformare se datorează modificării unei proteine plasmatice — fibrinogenul, care este transformat din stare solubilă în fibrină insolubilă, organizată în rețea, constituind armătura cheagului.

Transformarea fibrinogenului în fibrină este consecința acțiunii unei enzime proteolitice puternice, trombina. La rândul său trombina este produsul transformării unei proteine plasmatice, protrombina. Această transformare este finalul unui lanț de reacții enzimatice cu secvențialitate în cascadă, declanșate fie de contactul sângelui cu o suprafață neendotelizată, fie prin eliberarea de suc tisular. Formarea trombinei se află în permanent antagonism cu un sistem inhibitor, care asigură de așa natură echilibrul, încât fibrinogenul poate fi ușor și repede transformat în fibrină *in situ*, fără extinderea coagulării în circulația sistemică, ceea ce ar avea urmări grave.

În acest proces, prezența ionului de calciu este indispensabilă. Sângele nu coagulează, dacă în momentul recoltării sale, calciul este precipitat cu oxalat de Na, complexat cu citrat de Na, sau fixat pe o rășină schimbătoare de ioni. Incoagulabilitatea astfel obținută este reversibilă prin adăugare de calciu, proprietate care permite testarea coagulării plasmei, obținută prin centrifugare. Pe baza ei s-au putut și se pot efectua toate studiile privitoare la factorii, condițiile și mecanismele coagulării.

1) **Factorii coagulării.** În complexul proces al coagulării sunt implicați o serie de factori cu acțiune specifică și care au o triplă proveniență: din plasmă (Ca^{2+}, factorii proteici plasmatici), din țesuturi (tromboplastina tisulară) și din plachete (factorii plachetari). Pentru studierea lor însă este mult mai utilă împărțirea în două grupe funcționale: factorii propriu-ziși ai coagulării, care sunt factori biologici; factorii de mediu, care sunt factori fizicochimici.

Factorii biologici constituie grupa factorilor principali ai mecanismului de coagulare. Ei nu au însă toți același regim de existență, în sensul că unii se găsesc ca factori permanenți, în timp ce alții au o durată de viață efemeră (factori tranzitorii) fiind rezultatul extemporaneu al reacțiilor ce au loc între factorii permanenți.

Cu excepția Ca^{2+}, F_3 și F_5 plachetari, toți ceilalți factori permanenți sunt proteine, coloizi liofili macromoleculari, din grupa polielectroliților amfoteri și posedă proprietățile generale caracteristice acestui gen de

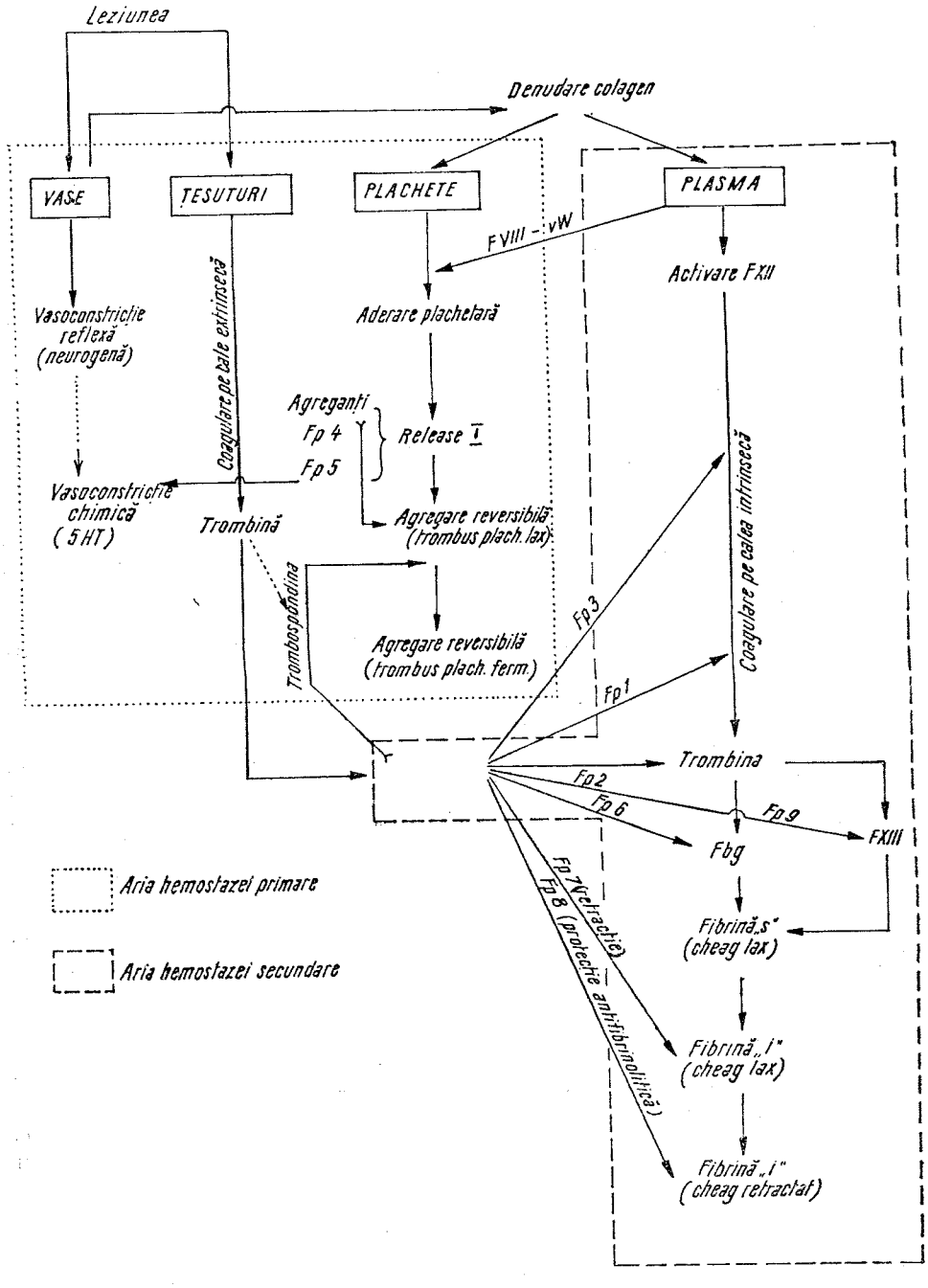


Fig. XIV.7. — Mecanismul hemostazei (în detaliu, hemostaza primară).

substanțe: se găsesc sub formă de sol, au presiune osmotică mică și putere de difuziune mică, prezintă fenomenul Tyndall, migrează în câmpul electric și sunt tensioactivi. În cadrul mecanismului plasmatic al hemostazei, ei participă pe rând la o serie de reacții, ce se desfășoară în cascadă.

Dezvoltarea rapidă în cunoașterea mecanismului coagulării din ultimii 40 de ani, a fost însoțită de o creștere paralelă a numărului de factori plasmatici implicați în coagulare. Cum însă aproape fiecare din ei a căpătat mai multe denumiri (după autorii respectivi), la primul Congres internațional al societății de tromboză (Basel, 1954), a fost constituit un Comitet internațional pentru nomenclatura factorilor coagulării care a recomandat nominalizarea factorilor prin numere romane, spre deosebire de factorii plachetari, nominalizați prin cifre arabe. Această recomandare a fost aprobată la Congresul de la Roma (1957), pentru factorii I—IX. Un an mai târziu, la Montreux, a fost aprobat FX, în 1961 au fost desemnați FXI și FXII, iar în 1963, factorul XIII. Această nomenclatură a fost stabilită în raport cu cronologia descoperirii factorilor și nu cu ordinea participării lor în mecanismul coagulării. În tabelul 14.II sunt prezentați sinoptic toți acești factori cu proprietățile caracteristice, care îi individualizează. Ei se află în plasmă în formă inactivă.

În cursul procesului coagulării, precursorii inactivi ai factorilor sunt transformați în formă activă, unii fiind apoi complet consumați, ca fibrinogenul, FV și FVIII; alții sunt parțial consumați, ca protrombina, FXI și FXII, iar alții rămân neconsumați în ser, cum sunt factorii VII, IX și X.

Activitatea biologică a oricăruia din factorii plasmatici ai coagulării a putut fi depistată și definită ca urmare a tulburării coagulării prin absența factorului respectiv din plasmă (realizată *in vitro*, prin diverse procedee tehnice), sau întâlnită *in vivo* la bolnavii cu sindroame hemoragice, rezultate din deficitul constituțional al unuia din factori. Dacă un factor al coagulării este definit prin activitatea sa biologică, absența acesteia nu este întotdeauna obligator sinonimă cu absența nemijlocită a factorului respectiv; uneori molecula acestuia poate suferi o mutație de structură, care duce la pierderea activității. Prezența acestor molecule cu structură anormală și inactivă în coagulare nu se poate pune în evidență decât prin precipitare cu anticorpi specifici.

Determinarea nivelului activității unui factor plasmatic al coagulării constă în măsurarea activității sale biologice în mediul care-l conține. Rezultatul poate fi exprimat fie în unități de timp (s), care exprimă viteza de reacție proporțională cu cantitatea de factor, fie în procente de activitate, prin raportare la un etalon de plasmă umană normală, considerat 100%.

Menținerea la un nivel stabil al activității factorilor plasmatici ai coagulării rezultă din echilibrul permanent care există între producerea lor continuă în organele formatoare (în special în ficat) și distrugerea sau eliminarea din circulație *(clearance)*.

Factorii tranzitori se caracterizează printr-o durată de viață foarte scurtă (de ordinul secundelor). Ei nu se află în plasma normală, ci apar numai în cursul procesului coagulării, fiind rezultatul anumitor reacții, ce au loc între factorii permanenți activați. De îndată ce au luat naștere, intră într-un nou sistem de reacții, în care fie se consumă, fie se inacti-

TABELUL 14.II

Factorii permanenți ai coagulării

Nr. din nomenclator	Sinonime	Natura chimică și G. M. (d)	Ultracentrifugare (unit. SV)	Pct. izoelectric (pH)	Sediu. Concentrație	Semiviață	Consum la coagulare	Stabilitate la conservare	Adsorbție pe $BaSO_4$	Filtrare prin asbest	Timp maxim de inactiv. la 56°C (min)	Decelabil imunologic	Sindromul clinic al deficienței
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
I	Fibrinogenul	β-globulină 340 000	7,60	5,8	Plasmă 200—400 mg/100 ml	4 zile	Da	Relativă	Nu	Da	1	Da	Afibrinogenemia Hipofibrinogenemia RISAK
II	Protrombina	α2-globulină 80 000	5,22	4,25	Plasmă (50—100 μg/ml) 300 U IOWA/ml; 1 U.I./ml	3 zile	Da 80—85%	Da	Da	Da	15	Da	Hipoprotrombinemia
III	Tromboplastina tisulară Trombokinaza Tromboplastina extrinsecă	Complex proteinofosfolipidic 167 000 000	330		Țesuturi: creier, testicul, plămân, placentă, leucocite	—	Nu	Da	—	—	120	Nu	—
IV	Ca^{2+}	$Ioni^{2+}$	—	—	Plasmă, ser 10 mg/ 100 ml	—	Nu	—	—	—	—	—	—

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
V	Proaccelerina *Labile factor* Plasma accelerator globulin P.P.C.F.	β-globulină 350 000	8,68	—	Plasmă, 0,01 mg/ml 1 U.I./ml	24 h	Da	Nu	Nu	Da	1	Nu	Parahemofilia Owren
VI	Anulat	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
VII	Proconvertina *Stable factor* Cotromboplastina S.P.C.A. Autoprotrombina I	β-globulină 50 000	3,34	—	Plasmă, ser 1 U.I./ml (0,001 mg/ml)	4 h	Nu	Da	Da	Nu	30	Nu	Parahemofilia Alexander
VIII-C (32)	F.A.H. „A", globulina antihemofilică A (AHG) Platelet cofactor I Trombo-plastinogen A	α2-crioglobulină 20 000	6,5	6,4	Plasmă 0,01 mg/ml (1 U.I./ml) (50—150 U/100 ml)	12 h	Da	Nu	Nu	Da	5	Da	Hemofilia A Boala von Willebrand
VIII-Ag	Fracția antigenică a F VIII	globulină 1 800 000	—	—	Plasmă 1 U/ml (60—140 μ/100 ml	36 h	Da	Da	Nu	Da	30	Da	Boala von Willebrand

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
VIII-vW	F. von Willebrand F. antisângerare F. Nillson Cofactorul ristocetinei	glicoproteină 200 000	—	—	Plasmă 1 U/ml (70—120 U/100 ml) În granulele din plachete	12 h	Da	Da	Nu	Da	30	Da	Boala von Willebrand
IX	F.A.H. „B" Christmas factor PTC, Platelet cofactor II Autoprotrombina II Tromboplastinogen B	β2-lipoproteina 57 000	4,33	—	Plasmă, ser 1 U.I./ml (0,01 mg/ml	30 h	Nu	Da	Da	Nu	15	Da	Hemofilia B
X	F. Stuart-Prower Autoprotrombina III Autoprotrombina C pentru forma X (a)	α1-globulină 56 000	4,23	4,75	Plasmă, ser 1 U.I./ml	48 h	Nu	Da	Da	Nu	12	Da	Deficitul de F. Stuart-Prower
XI	F. Rosenthal PTA	β2-globulină 180 000	—	—	Plasmă, ser (U.I./ml) 0,01 mg/ml plachete	60 h	50%	Da	Parțial	Da	30	Nu	Sindrom Rosenthal

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
XII	F. Hageman Contact factor *Surface factor*	β2-globulină 80 000	7,08	7,8	Plasmă, ser 0,05 mg/ml (1 U.I./ml)	50 h	50%	Da	Parțial	Da	30	Da	Deficiența Hageman
XIII	F.S.F., Fibrinaza Factorul L.L	2 subunit. „A" de 75 000; 2 subunit. „B" de 85 000 Total 300 000	—		Plasmă și ser (1 U/ml) 0,02 mg/ml plachete 0,01 mg/ml	7 zile	Da	Da	Nu	Da	5	Da	Deficiența de F.S.F.

vează. Aceti factori care nu figurează în nomenclator din cauza existenței lor efemere sunt în număr de cinci:

a) *Produsul activării de contact* (PAC) este rezultatul combinării între FXII și FXI, atunci când primul s-a activat prin contactul plasmei cu o suprafață străină. Această activare se face lent și progresiv; ea poate dura câteva minute, fiind reacția cu timpul cel mai lung din cadrul mecanismului coagulării. În intimitatea activării FXII un rol important revine chemosorbției, care declanșează fenomenul de activare (vezi fig. XIV.14); al doilea rol revine kalikreinogenului sau prekalikreinei (F. Fletcher), care în tandem cu kininogenul cu moleculă mare (HMWK) (F. Fitzgerald) sunt activați și ei și intervin în reacția de activare a FXII, potențializând-o și înlesnind astfel formarea de FXII mai repede (vezi fig. XIV.13). PAC se comportă în reacția ce urmează ca o enzimă, acționând asupra FIX, pe care-l activează. PAC este caracteristic căii intrinseci a coagulării, el lipsind în calea extrinsecă.

b) *Produsul intermediar I* (PI I) poate avea o dublă origine: pe calea intrinsecă rezultă din combinarea FIX (activat de PAC) cu FVIII-C (în prezența F3p); pe calea extrinsecă este produsul combinației tromboplastinei tisulare cu FVII. Produsul prezintă o deosebită importanță în coagulare, fiind singurul în măsură să activeze FX, care reprezintă placa turnantă a întregului edificiu al timpului plasmatic. Veninul de viperă Russell (Rvv) are acțiune idetnică cu PI I.

c) *Produsul intermediar II* (PI II) este rezultatul combinației

dintre FX (activat de PI I) cu un fosfolipid, care poate avea o dublă proveniență: în calea extrinsecă este cefalina (eliberată în sucul celular în urma leziunii tisulare), iar în calea intrinsecă este F3p (eliberat de plachete).

d) *Protrombinaza*, denumită în trecut tromboplastină activă (spre deosebire de cea tisulară, care este inactivă), rezultă din combinarea PI II cu FVI. Ea clivează din molecula de FII o moleculă de trombină, enzima de bază a coagulării. Această generare a trombinei se petrece în 3 trepte (fig. XIV.8).

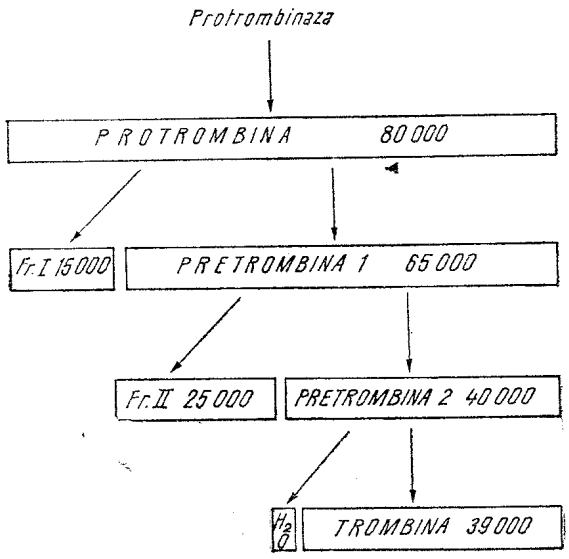


Fig. XIV.8. — Generarea trombinei.

e) *Trombina*, cea mai activă și potentă enzimă a coagulării, se formează în urma hidrolizei protrombinei, realizată de protrombinază. Are două forme active: α (39 000 d), foarte sensibilă la acțiunile ATIII și β (28 000 d), puțin sensibilă la acțiunea ATIII; fiziologic, forma α este predominantă. Este o enzimă proteolitică, care hidrolizează legăturile peptidice dintre doi acizi aminați (arginină și glicină). Situsul activ al trombinei este constituit dintr-un reziduu de serină activă.

Hidroliza trombinică are o triplă specificitate: de legătură (arginin-glicidă), de proteină (fibrinogen) și de specie (om). În urma acțiunii sale, molecula de fibrinogen este clivată, rezultând un monomer de fibrină și două perechi de fibrinopeptide — A și B. Clivajul se realizează în trei faze: 1) trombina se aranjează în jurul moleculei de fibrinogen, la nivelul legăturilor pe care le va rupe, formând complexul trombină-fibrinogen; 2) trombina se desprinde de molecula de fibrinogen, împreună cu fibrinopeptidele (fenomen de acilare); ceea ce rămâne din molecula de fibrinogen se numește monomer de fibrină; 3) fibrinopeptidele sunt transferate apei, iar trombina este eliberată, capabilă de o nouă reacție (fenomenul de dezacilare) (fig. XIV.9).

Într-un stadiu imediat următor, acestui proces de clivaj, ca urmare a dezvelirii sarcinilor lor electronegative, monomerii de fibrină se polimerizează în două sensuri: mai întâi longitudinal și apoi transversal, dând naștere gelului de fibrină, care constituie scheletul cheagului (fenomenul de policondensare) (fig. XIV.10). În subsidiar, trombina mai are și alte acțiuni în cadrul mecanismului coagulării:

a) La nivelul trombusului plachetar, eliberând din plachete trombospondina, transformă agregarea reversibilă în ireversibilă, inițiind apoi procesul de *release* II; b) activează FXIII care-i urmează cronologic în

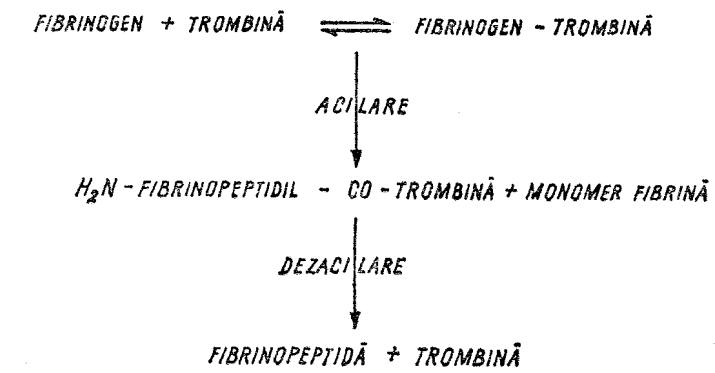


Fig. XIV.9. — Acțiunea trombinei asupra fibrinogenului.

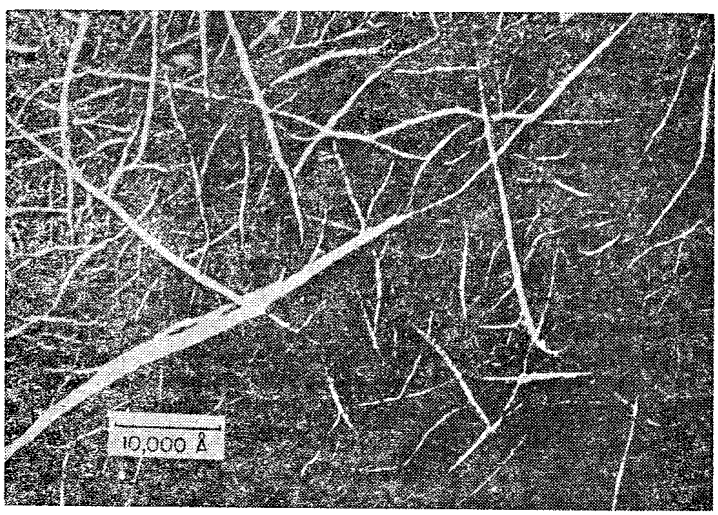


Fig. XIV.10. — Policondensarea monomerilor de fibrină

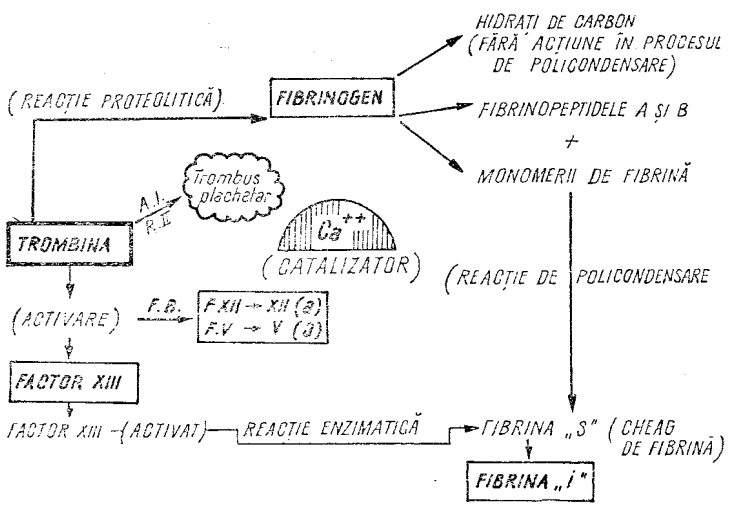


Fig. XIV.11. - Acțiunile trombinei.

cascada mecanismului coagulării, pentru ca acesta să transforme fibrina „s" în fibrină „i"; c) printr-un fenomen de *feedback* (denumit în schema clasică autocatalizã), activează reacţiile ce o precedă (FXII şi FV) pentru ca să se formeze mai repede şi mai multă trombină.

Aceste acţiuni se explică prin faptul că toţi factorii de mai sus, asupra cărora lucrează trombina, au în structura lor moleculară situsuri asemănătoare cu ale fibrinogenului.

Factorii de mediu sunt temperatura, pH-ul şi forţa ionică. *In vivo,* homeostazia organismului asigură pe multiplele sale linii de manifestare, condiţii constante pentru toţi aceşti factori, deci ei nu constituie o preocupare pentru studiul hemostazei. Importanţa lor devine însă preponderentă în condiţiile studiului coagulării *in vitro,* unde cea mai mică abatere de la condiţiile optime (37°C, pH=7,35 şi o forţă ionică =0,1) produce asemenea perturbări ale mecanismului coagulării, încât falsifică rezultatele. De aceea, studiile de coagulare trebuie executate obligatoriu într-o baie termostatică exactă şi cu tampoane ale căror pH şi forţă ionică să fie precis determinate.

2) **Mecanismul coagulării** este complex şi constă dintr-o serie de reacţii etajate în cascadă, care încep cu leziunea vasculotisulară şi sfârşesc cu formarea cheagului trombodinamic, ce asigură hemostaza definitivă în teritoriul în care s-a produs efracţia vasculară. Termenul de „cascadă" exprimă mersul în trepte al procesului, în care reacţia din treapta inferioară este condiţionată de produsul final al treptei superioare. Cinetica procesului este reprezentată de viteza reacţiilor ce se fac între factorii amintiţi anterior.

Mecanismul coagulării se desfăşoară pe două căi: extrinsecă şi intrinsecă, deosebite după originea tisulară sau sanguină a factorului de start. Neavând însă acelaşi număr de trepte, calea extrinsecă este mai scurtă (secunde) decât cea intrinsecă (minute), pe care, graţie acestui decalaj de timp, o condiţionează, amplificând-o printr-un *feedback* autocatalitic.

a) *Calea extrinsecă* se desfăşoară în două etape: generarea protrombinazei şi generarea trombinei (fig. XIV.12).

1. *Generarea protrombinazei:* factorul de declanşare îl constituie sucul celular pus în libertate de celulele ţesutului lezat. În conţinutul său intră tromboplastina (factor proteic), cuplată cu cefalina (factor fosfolipidic). Venind în contact cu sângele (extravazat la locul leziunii) această substanţă se combină (în prezenţa ionilor de calciu) cu FVII plasmatic, dând naştere produsului intermediar I şi eliberând cefalina. Produsul intermediar I acţionează imediat asupra FX (prezent în plasmă sub formă inactivă) pe care-l activează puternic, făcându-l astfel capabil să se combine cu cefalina (rămasă liberă din reacţia treptei anterioare); rezultatul acestei combinaţii este produsul intermediar II, care interacţionează instantaneu cu FV şi rezultă protrombinaza. Aceasta este un complex lipoproteic, suport al activităţii enzimatice responsabile de conversiunea protrombinei în trombină. În concepţia modernă acest complex este reprezentat grafic de o asociaţie între molecula de $FX_{(a)}$ şi cea de FV, grupate prin intermediul unei micele fosfolipidice (cefalină). În contextul protrombinazei, factorul $X_{(a)}$ este cel eficient; de altfel, el poate şi singur să transforme protrombina în trombină, dar încet şi în cantitate mică.

În prezența fosfolipidului, activitatea sa crește apreciabil, dar numai la adaosul de FV, ea devine aproape explozivă. FV are deci rolul de cofactor necesar activității $FX_{(a)}$; această funcție o îndeplinește mult mai viguros, de îndată ce a fost la rându-i activat de mici cantități de trombină (vezi fig. XIV.11), acțiunea de *feedback* autocatalitic a trombinei. Singur, FV nu are nici o acțiune asupra protrombinei. FVII, singurul factor caracteristic căii extrinseci, nu se consumă în timpul coagulării, ci se

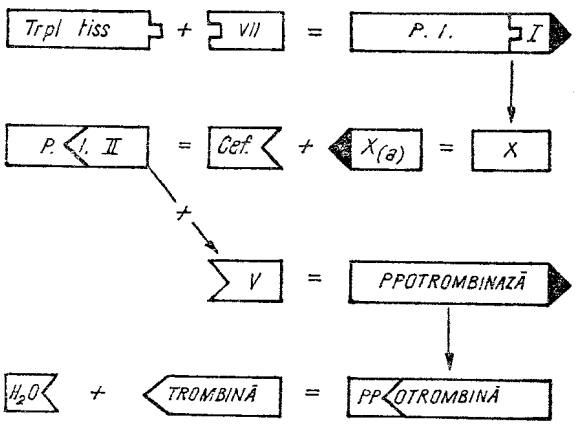


Fig. XIV.12. — Calea extrinsecă a coagulării.

activează, formă sub care este regăsit în ser. Activarea sa se produce prin reacția cu tromboplastina tisulară, în prezența ionilor de calciu, finalul acestei reacții fiind produsul intermediar I. Acesta activează FX și după aceea se desface în FVIIa și unii produși de catabolism proteic fără activitate în coagulare, dintre care o parte se elimină, iar o alta se metabolizează.

2. *Generarea trombinei;* protrombinaza, pe măsură ce se formează, atacă molecula de protrombină (FII), din care clivează o moleculă de trombină (vezi fig. XIV.8). Pe calea extrinsecă, cantitatea de protrombinază și de trombină formate, sunt reduse. Trombina aceasta nu coboară la treapta următoare spre a ataca fibrinogenul; printr-un fenomen de *feedback,* ea urcă la treptele superioare, la ultima fază a timpului vasculoplachetar, acționând la nivelul trombusului plachetar, unde transformă agregarea reversibilă în agregare ireversibilă (trombusul lax în trombus ferm) și declanșează fenomenul de *release* II al plachetelor. Aceasta are ca urmare punerea în libertate din interiorul lor a factorilor plachetari, cu rol deosebit în calea intrinsecă.

Trombina formată pe calea extrinsecă a coagulării, este identică din punct de vedere fizicochimic cu cea formată pe calea intrinsecă; ele sunt diferite prin funcția biologică pe care o au de îndeplinit.

Conversia protrombinei în trombină poate fi efectuată și de alte enzime decât protrombinaza (de exemplu: tripsina și chiar stafilocoagulaza); trombina astfel obținută, deși are aceeași activitate în coagulare cu cea fiziologică, diferă totuși de aceasta prin câțiva parametri fizicochimici.

b) *Calea intrinsecă* (fig. XIV.13) se desfășoară în patru etape: 1) generarea protrombinazei; 2) generarea trombinei; 3) transformarea fibrinogenului în fibrină cu stabilizarea fibrinei și 4) sinereza și retracția cheagului.

1) *Generarea protrombinazei:* protrombinaza căii intrinseci este elaborată exclusiv de factori sanguini. Lanțul reacțiilor lor este declanșat de fenomenul de contact, ce are loc la nivelul leziunii vasculare între supra-

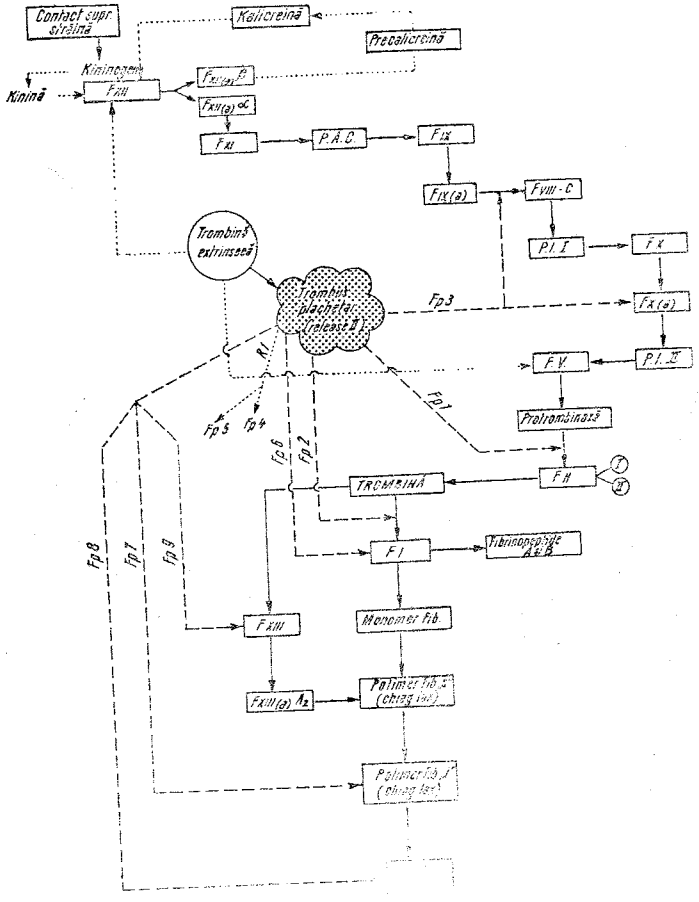


Fig. XIV.13. — Calea intrinsecă a coagulării.

fața devenită umectabilă și FXII inactiv din plasmă. Urmare acestui fenomen de suprafață este activarea FXII.

Procesul se desfășoară astfel (fig. XIV.14): când FXII inactiv (cu funcțiile chimice blocate de inhibitorul său fiziologic) ajunge în câmpul electronegativ al suprafeței adsorbantului (care *in vivo* este leziunea vasculară, iar *in vitro* orice perete de sticlă sau metal), are loc o polarizare, adică o deplasare reciprocă de electroni între cei doi competitori. Ca ur-

mare, kininogenul cu moleculă mare (HMWK) (F. Fitzgerald), adsorbit pe molecula de FXII pe partea cu inhibitorul, se adsoarbe pe fibrele de colagen și se activează în kinină. Aceasta acționează asupra moleculei de FXII și ca urmare o foarte mică cantitate de FXII devine activă; lanțul polipeptidic unic al moleculei de FXII se scindează în 2 sublanțuri: greu (52 000 d, $XII_{(a)}$ α) și ușor (28 000 d, $XII_{(a)}$ β). Lanțul greu începe să acționeze asupra FXI,, iar cel ușor activează kalikreinogenul (F. Fletcher) din plasmă în kalikreină care dezlipește molecula de FXII de cea a inhibi-

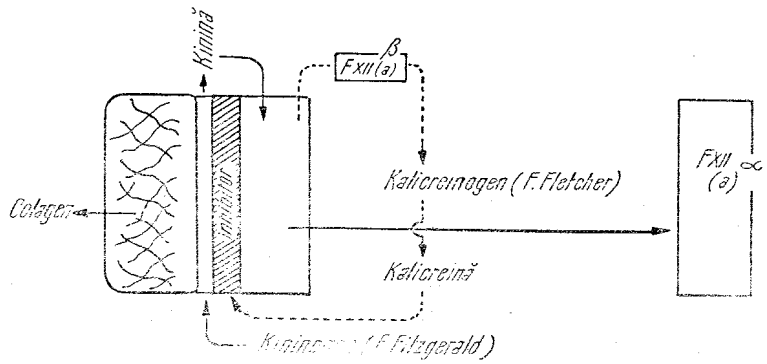


Fig. XIV.14. — Mecanismul activării FXII.

torului (ce rămâne fixat pe complexul colagen-kinină) și o pune în libertate ca $FXII_{(a)}$ α. Acesta inițiază întreaga cascadă a coagulării din calea intrinsecă.

Factorul $XII_{(a)}$ α se combină imediat cu FXI (fără să necesite prezența de Ca^{2+}) și dă naștere produsului activării de contact. Acesta acționează asupra FIX, pe care-l activează, făcându-l apoi să se combine cu FVIII-c și să dea naștere produsului intermediar I. Reacția nu se petrece decât în prezența de F_P3. Iar PI I are o structură chimică și o acțiune identică cu a omologului său din calea extrinsecă, adică activează FX. Din ocest moment, treptele cascadei căii intrinseci devin identice cu cele ale căi extrinseci; factorul X activat se combină cu factorul 3 trombocitar (fosfolipoid de origine plachetară pus în libertate în urma procesului de *release* II) și dă naștere produsului intermediar II; acesta se combină mai departe cu FV și rezultă protrombinaza.

După cum se vede, generarea protrombinazei pe calea intrinsecă este mult mai complexă decât pe cea extrinsecă; de aceea, și ritmurile ei de formare sunt diferite: pentru cea extrinsecă sunt necesare secunde, iar pentru cea intrinsecă, minute.

2) *Generarea trombinei;* protrombinaza (care pe această cale se formează în cantitate mult mai mare decât pe cea extrinsecă) atacă protrombina, clivând din fiecare moleculă a acesteia câte o moleculă de trombină și 2 fracțiuni proteice. (Dintre ele, fracțiunea II protejează trombina de acțiunea ATIII; ea este inhibată de proteina $C_{(a)}$) (Vezi fig. XIV.23). La această acțiune, protrombinaza este ajutată de F_1 plachetar (eliberat din plachete prin *release* II). Tot la această acțiune participă complementar și indirect, dar foarte util, F_4 plachetar (eliberat în urma fenomenului de *release* I); rolul său este de a neutraliza heparina fiziologică, care

fiind o antitrombină ar inactiva trombina. Pe măsura formării sale, reacția aceasta ar avea urmări negative asupra coagulării. Trombina, produsă în cantitate mare și cu acțiune explozivă, coboară la treapta următoare a cascadei, cu eficiență descendentă (reamintim că trombina generată pe cale extrinsecă are eficiență ascendentă).

Protrombina cu molecula incompletă (FII-Ag sau PIVKA = *Protein induced by vitamin K absence)* este convertită de protrombinază în trombină, dar anevoios, și în cantități foarte reduse, deși din punct de vedere imunologic ea reacționează cu anticorpii antiprotrombină la fel ca cea normală. Veninurile de Taïpan și Echis sunt protrombinaze; ele generează trombina din molecula de protrombină.

3) *Formarea fibrinei* este una din fazele terminale ale mecanismului coagulării; în cadrul ei ia naștere cheagul de fibrină. La această fază participă două enzime și, ca atare, ea se subîmparte în două momente, care se succed.

— Transformarea fibrinogenului în fibrină: trombina, enzimă proteolitică, născută la finele fazei anterioare, atacă molecula de fibrinogen și clivează din ea patru mici molecule (G.M.=2 500): o pereche de fibrinopeptide A și una de fibrinopeptide B; ceea ce rămâne din molecula mare de fibrinogen este un monomer de fibrină (vezi fig. XIV.5). În această acțiune este ajutată de F_2 plachetar (eliberat din plachete din *release* II).

În veninurile anumitor șerpi există substanțe denumite *reptilaze* (von Klobusitzky) cu acțiune *trombin-like* asupra fibrinogenului; veninul viperei braziliene *(Bothrops)* și al viperei malaeze *Ancistrodon rhodostoma)* liberează însă numai cele 2 fibrinopeptide A, iar veninul viperei malaeze *Ancistrodon contortrix* liberează numai cele două fibrinopeptide B.

Fibrinogenul este o proteină majoră a plasmei cu moleculă dimeră, formată din 2 subunități identice cu ax de simetrie între ele. Unirea celor 2 subunități se efectuează prin 3 legături disulfidice, asimetrice, pe mijloc (1 leg. α—α și 2 leg. γ—γ). Fiecare subunitate este compusă din 3 lanțuri peptidice (α, β și γ) legate între ele prin 4 punți disulfidice: 2 leg. α—β, 1 leg. β—γ și 1 leg. α—γ. Zona celor 3 legături sulfidice comune și a celor 4 perechi de punți disulfidice formează „nodul disulfidic terminal" al moleculei de Fbg, zonă cu G.M. de 50—60 000 d, în cadrul căreia are loc acțiunea trombinei. Pe lanțul α, trombina hidrolizează legătura 16—17 (gly—arg), desprinzând un fragment de 16 aminoacizi denumit fibrinopeptida A. Pe lanțul β trombina hidrolizează legătura 14—15 (gly—arg), desprinzând un fragment de 14 aminoacizi, denumit fibrinopeptida B. Pe lanțul γ trombina nu acționează (fig. XIV.15).

Molecula de fibrinogen are, ca extremități N-terminale, 2 alanine, 2 pirolidone, 2 tirozine; monomerul de fibrină păstrează 2 tirozine și câștigă 4 glicine (fig. XIV.16 și fig. XIV.17). Clivajul trombinic are loc, după cum s-a văzut, la nivelul legăturii glicină-arginină.

Fibrinopeptida A conține alanina, iar fibrinopeptida B, pirolidona. Separarea fibrinopeptidelor se face cu viteze inegale: prima pereche desprinsă este A și după aceea se desprinde perechea B. Acest clivaj proteolitic reprezintă de fapt unicul aspect al acțiunii trombinei în această fază; ceea ce urmează imediat nu implică câtuși de puțin acțiunea acestei enzime. Este vorba de un fenomen de polimerizare (policondensare)

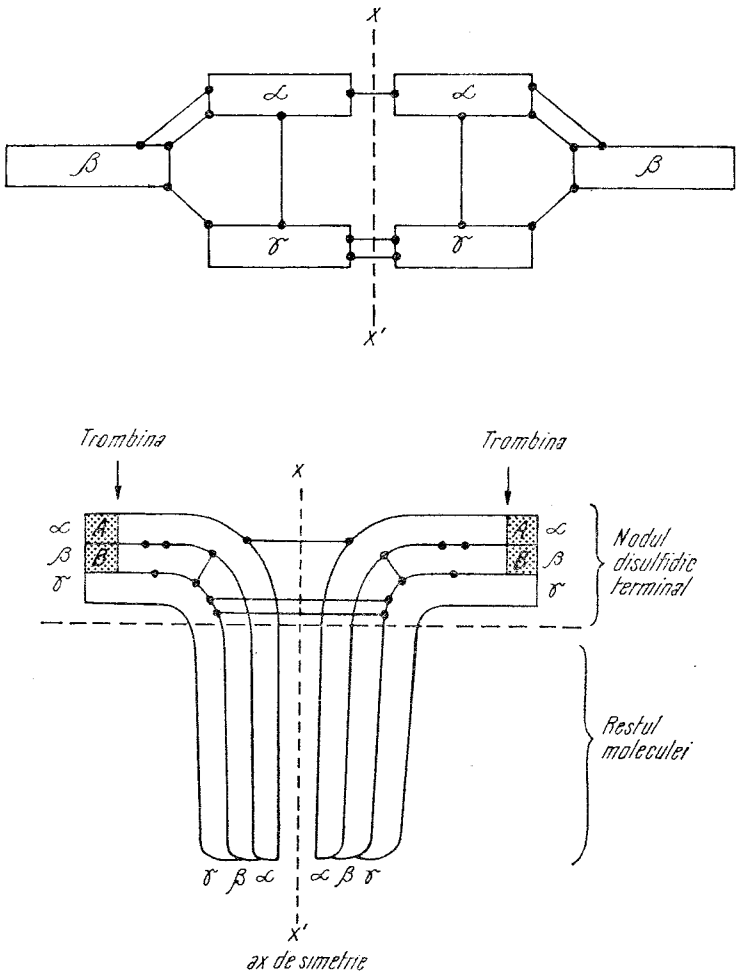


Fig. XIV.15. — Structura moleculei de fibrinogen.

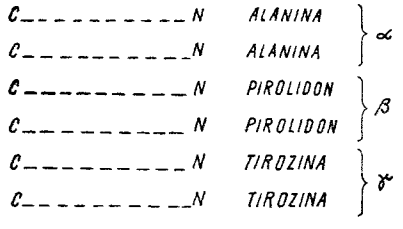


Fig. XIV.16. — Structura terminală a fibrinogenului.

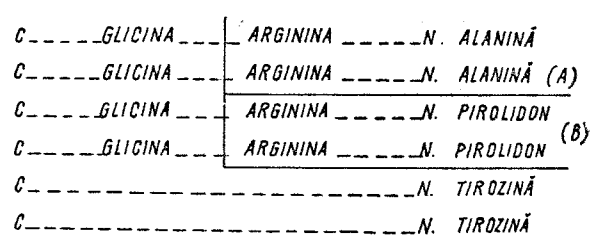


Fig. XIV.17. — Formarea monomerului de fibrină.

a monomerilor de fibrină, care se petrece după două direcții spațiale: mai întâi monomerii se acolează cap la cap (polimerizare longitudinală) și dau naștere fibrelor primare (sau fibrilelor) de fibrină și apoi se acolează lateral (polimerizare transversală), dând naștere fibrelor secundare de fibrină (sau fibrelor propriu-zise). Polimerizarea longitudinală are loc între capetele monomerilor (dezvelite în urma desprinderii fibrinopeptidelor); cea transversală se face prin legături laterale (punți) de H, între tirozina și histidina din două fibre primare (fig. XIV.18).

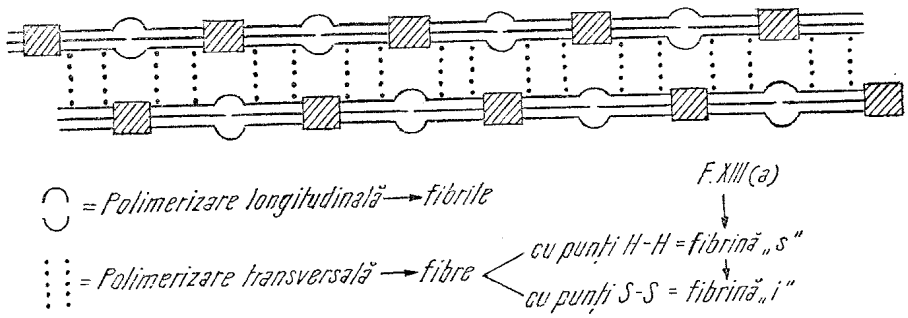


Fig. XIV.18. — Polimerizarea monomerilor de fibrină și stabilizarea cheagului.

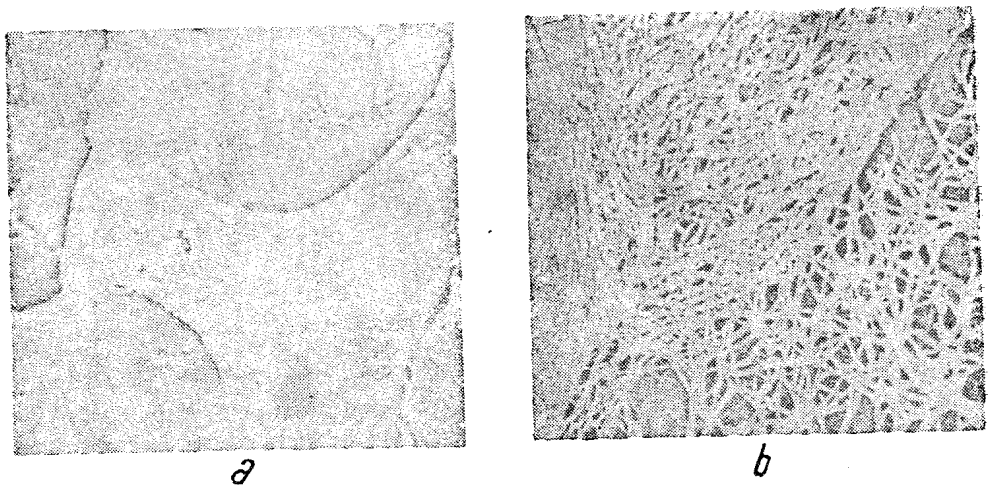


Fig. XIV.19. — *a* — Fibrină „s"; *b* — Fibrină „i".

După pH-ul la care are loc polimerizarea, se obțin cheaguri cu arhitecturi deosebite. La pH alcalin domină polimerizarea longitudinală, care dă naștere la cheaguri străvezii, cu structuri fibrilare fine și lungi. La pH acid predomină polimerizarea transversală, care produce cheaguri dense, cu structuri grosolane (fig. XIV.19 a și b).

Fenomenul de policondensare al monomerilor de fibrină poate fi perturbat (frenat) de prezența anormală a paraproteinelor sau a produșilor de degradare ai fibrinei (FDP). Fenomenul de dublă polimerizare are ca ur-

mare schimbarea stării de sol a monomerilor de fibrină în stare de gel. El se obiectivează în final chiar pentru ochiul liber, deoarece apare cheagul de fibrină, cheag mare și lax, format din fibrină nestabilizată, solubilă în soluție de uree 5 M, fapt pentru care este denumită fibrina „S" (legăturile de H sunt rupte de uree în această concentrație). În această fază, fenomenul este deci încă reversibil.

Pe toată durata reacțiilor chimicoenzimatice din calea intrinsecă, care se sfârșesc cu formarea cheagului, se produce și o vasoconstricție care menține solid în poziție cheagul format, spre a nu fi luat de fluxul circulației; cele două fenomene trebuie să coexiste concomitent, pentru ca să-și atingă scopul. Această vasoconstricție este indusă chimic, fiind produsă de 5-hidroxitriptamină (5—HT) sau serotonină (este vorba de F_p5, eliberat din plachete prin *release* I). Ea continuă vasoconstricția reflexă apărută în primele momente ale declanșării hemostazei și care ținea de mecanismul vascular al acesteia.

— Stabilizarea fibrinei; pentru ca rețeaua de fibrină să devină definitivă și formarea cheagului ireversibilă, fibrina trebuie să se stabilizeze, adică să devină insolubilă. Procesul este realizat de FXIII. Cel de origine plachetară este activ (A_2); cel de origine plasmatică este inactiv (A_2B_2) și trebuie activat de trombină (la finele acțiunii sale asupra fibrinogenului). FXIII activat (FXIII—A_2) înlocuiește punțile de H prin punți disulfurice (între glicina N-terminală a unui monomer și radicalul NH_2 de pe monomerul vecin); fibrina astfel modificată nu mai este solubilă în uree. Această fibrină stabilizată se numește fibrina „i" (insolubilă); noua sa condiție calitativă conferă cheagului un comportament biochimic normal (vezi fig. XIV.18).

Factorul XIII, denumit și factorul stabilizant al fibrinei sau fibrinaza, se găsește sub formă inactivă în plasma sanguină și placentă. În urma *activării* sale de către trombină, FXIII-A_2 stabilește legături covalente prin punți disulfidice între monomerii de fibrină, acțiune care-l etichetează ca o transamidază, transglutaminază sau aminoacil transferază. FXIII plasmatic (A_2B_2) are G.M.=320 000, iar cel plachetar (A_2) numai 170 000. Aceasta înseamnă că cel plachetar iese din plachete gata activat, nu mai necesită activare trombinică pentru a acționa.

Dar activitatea FXIII nu se limitează aici. Cheagul stabilizat începe să fie colonizat de fibroblaștii țesutului conjunctiv din jur; acest fenomen nu are loc în lipsa FXIII. Cercetări recente au arătat mecanismul intim de fixare a fibroblaștilor pe fibrele de fibrină. Fibroblastul sintetizează în membrana sa o proteină denumită *„cold insoluble globulin"*, care este fixată pe fibra de fibrină numai prin acțiunea transpeptidazică a FXIII-B_2. După colonizare, FXIII-B_2 exercită o stimulare puternică a proliferării fibroblaștilor care, prin sinteză sporită de colagen (componentul de bază al țesutului de susținere), contribuie activ la creșterea rapidității și calității vindecării plăgii. Fibroblaștii din culturi au o creștere slabă, dacă nu au în mediu de cultură FXIII; la adăugarea acestuia, creșterea se multiplică de 4—6 ori. Pacienții cu deficit constituțional de FXIII, după intervenții chirurgicale prezintă o vindecare dificilă a plăgii; tratați cu FXIII, ei au o vindecare normală (3, 5, 15, 45, 56, 64).

4) *Sinereza și retracția cheagului;* cheagul de fibrină „i", deși din punct de vedere chimic este stabilizat, nu este însă și funcțional, deoa-

rece este lax și nu are suficientă rezistență la șocurile hemodinamice din teritoriul reologic respectiv. Pentru corectarea acestei deficiențe, el este supus la două fenomene fizice subsecvente: sinereza și retracția.

Sinereza este fenomenul de concentrare spontană a gelurilor prin eliminarea unei cantități relativ mici de apă și electroliți, micșorându-se în acest fel spațiile dintre fibrile pe axa lor transversală. În felul acesta, structura reticulară a polimerului devine mai densă și deci mai omogenă, fără a-și modifica însă lungimea. Se realizează un fel de înmănunchiere a fibrelor de fibrină, pentru ca cheagul să poată corespunde anumitor norme biologice de densitate și omogenitate, care determină un anumit grad de rezistență mecanică, conferindu-i astfel calități hemostatice. Prin expulzarea apei de reacție a gelului din ochiurile cheagului, acesta seamănă în final cu un burete încă lax și plin de aer: este „cheagul lax omogen reticulat". Volumul său diminuează cu circa 15%. Acest cheag nu răspunde decât în parte nevoilor hemostatice pentru care a fost creat; funcția sa trombodinamică nu este încă completă. La terminarea sinerezei, în punctele de intersectare a fibrelor de fibrină, se află plachete care constituie centrii mecanici și energetici ai procesului de retracție.

Retracția este fenomenul care completează etapa începută de către sinereză. Ea are loc numai în prezența plachetelor, acestea trebuind să se afle în număr suficient și cu funcționalitate normală și este rezultatul acțiunii proteinei contractile din citoplasma plachetelor, cunoscută sub numele de trombostenină sau F_7 plachetar (înrudită cu actomiozina musculară). Prin studii de difracție a razelor X pe textura intimă a cheagului de fibrină s-a constatat că, în timp ce cheagul format în urma acțiunii trombinei asupra fibrinogenului pur este absolut omogen și nu se retractă, trama cheagului format prin acțiunea trombinei asupra plasmei are un aspect neomogen, fibrele de fibrină întrețesându-se cu trombocite, care formează veritabile microcentre nodale de coagulare; aceste cheaguri sunt retractile. Mecanismul intim al retracției cheagului este următorul: în cursul procesului de *release* II, plachetele expulzează din citoplasma lor granule de trombostenină, care devin filiforme și se acolează de fibrele de fibrină, pe măsură ce are loc formarea lor. Plachetele efectuează un mare efort metabolic final, furnizând prin clivarea moleculelor macroergice de ATP (aflate în mare număr în citoplasmă), energia necesară contracției filamentelor de trombostenină, acolate de fibrele de fibrină. Spre deosebire de sinereză, în care fibrele de fibrină sunt cele active, în retracție ele sunt pasive, activă fiind trombostenina; ea se contractă realizând o micșorare importantă în sensul longitudinal al fibrelor, urmată implicit de o mare creștere a densității cheagului. Spre deosebire de contracția musculară, care este repetabilă, și uneori chiar periodică, retracția este unică, finală și ireversibilă. Ea diminuează volumul cheagului la 1/8 din cel inițial, expulzând din ochiurile sale tot serul. Cheagul rămas este mic și dens și se numește cheag retractat sau ferm. El corespunde întru totul necesităților trombodinamice ale hemostazei. Acest cheag este protejat împotriva unei eventuale trombolize precoce, de către F_8 plachetar (antifibrinolizina) eliberat în cursul fazei *release* II.

Comparând cele două căi ale coagulării (fig. XIV.12; XIV.13), se constată că ele posedă atât factorii proprii, cât și câțiva comuni. Astfel, tromboplastina tisulară, FVII și cefalina se întâlnesc numai în calea extrinsecă, în timp ce FXII, FXI, FIX, FVIII și F_3 plachetar sunt caracteristice căii intrinseci. Factorii X, V, II, I și Ca^{2+} sunt comuni ambelor căi: calciul este catalizatorul indispensabil întregului proces de coagulare prin ambele căi (mai mult solicitat în unele faze și mai puțin în altele), ale căror trepte nu-și pot desfășura reacțiile în lipsa sa.

Mai trebuie amintit faptul că nu toți factorii coagulării se consumă în cursul acestui proces; dacă la început sunt toți prezenți în plasmă, la sfârșit în ser se găsesc numai cei neconsumați sau parțial consumați (fig. XIV.20); toți cei neconsumați se află în stare activată.

Sistemul inhibitor al coagulării (53) cuprinde o serie de inhitori, ce se pot grupa în două categorii: anticoagulanți circulanți și antifactori.

a) *Anticoagulanții* sunt inhibitori fiziologici dirijați nu împotriva factorilor permanenți ai coagulării, ci contra celor tranzitorii, intermediari. Ei sunt de trei tipuri: antiprotrombinaza, antitrombinele și proteina C; dar sunt specifice împotriva respectivelor enzime. Antiprotrombinaza, ca și proteina C, este unică. Antitrombinele sunt în număr de patru și au rol important în menținerea activității trombinei la niveluri fiziologice, dat fiind că producerea acesteia este explozivă, iar activitatea ei instantanee. Acestea sunt notate cu cifre romane: I, II, III și VI (IV și V nu mai figurează în nomenclatorul internațional).

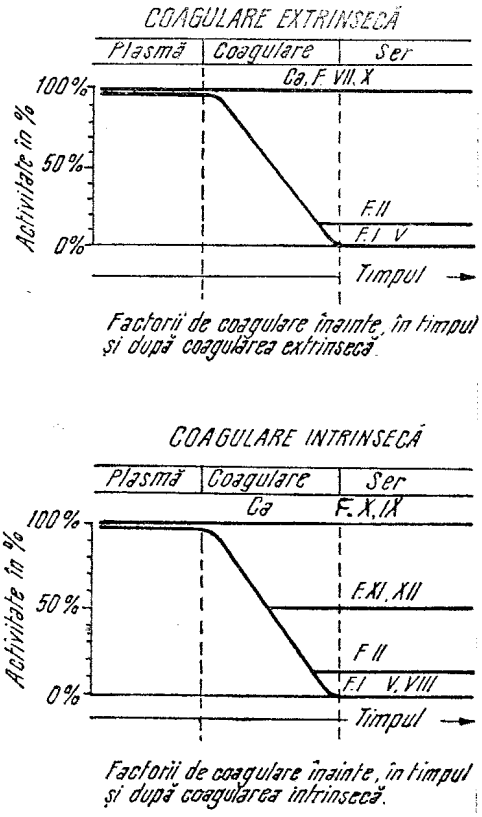


Fig. XIV.20. — Factori de coagulare înainte, în timpul și după coagularea extrinsecă și intrinsecă.

— Antitrombina I este însăși fibrina; în cursul fibrinoformării, trombina este treptat adsorbită pe fibrina recent elaborată și, astfel, inactivată. Capacitatea de adsorbție a fibrinei față de trombină este considerabilă; cheagul format din 1 ml de plasmă este capabil să fixeze 1 000 U trombină. Aceasta împiedică coagularea progresivă din aproape în aproape și deci extensia cheagului mult peste limitele leziunii vasculare.

— Antitrombina II (AT-II) sau α_2 — macroglobulina (α_2-M) este o proteină plachetară (granulele lizosomale) și plasmatică cu G.M.=725 000 d.

Ea inhibă acțiunea trombinei, formând cu ea un complex ireversibil. Inhibarea este însă lentă și reprezintă cca 25% din întreaga capacitate de inhibare a plasmei față de trombină (restul de 75% aparține AT-III). Procesul are loc numai în prezența fibrinogenului. În prezența heparinei, AT-II inhibă trombina în 3—4 minute, în timp ce AT-III realizează aceasta în 10—20 secunde. Nivelul de α_2-M în plasmă este scăzut în afecțiunile hepatice severe și crescut în nefroze (la normali se găsesc 285 ± 15 mg la 100 ml plasmă).

— Antitrombina III (AT-III), denumită și antitrombina progresivă este antitrombină de bază; ea se adsoarbe pe fibrele de fibrină (mai puțin competitiv însă decât trombina) și efectuează acolo neutralizarea trombinei rămase eventual în exces. Acțiunea ei lentă o împiedică să producă această neutralizare înainte ca trombina să-și fi realizat activitatea sa specifică asupra fibrinogenului. AT-III este proteina plasmatică principală a mecanismului de inactivare progresivă a trombinei, la care participă în proporție de 75% (restul este realizat de alfa$_2$-macroglobulină). Totalul activității AT-III+AT-II dintr-un ml de plasmă normală inactivează 300 U NIH trombină. AT-III migrează electroforetic între α_2- și β globuline și are o G.M.=65 000 d. Ea este sintetizată de ficat și distribuită în toate umorile organismului. Durata sa de viață este de $2{,}7 \pm 0{,}3$ zile. Se găsește în plachete (în granulele lizosomale) și în plasmă în proporție de 80—100 U/100 ml (2—3 mg/ml). Nivelul său se poate determina prin metode de coagulare biochimice și imunologice. Singură, inactivează trombina încet și progresiv; în prezența heparinei, care acționează ca un cofactor, inactivarea devine aproape instantanee. De aceea AT-III este denumită și cofactorul heparinei. Acțiunea anticoagulantă a heparinei depinde de nivelul de AT-III plasmatic; când acesta este deficitar, bolnavul nu răspunde satisfăcător la tratamentul cu heparină. AT-III inactivează secundar și alți factori activați ai coagulării: VII_a, IX_a, X_a, XI_a și XII_a, dar mai ales pe X_a. Din acest motiv i se mai spune și inactivatorul FX_a.

În timpul coagulării, AT-III este parțial consumată, ea regăsindu-se în ser în proporție de 50% față de concentrația normală din plasmă. Molecula de AT-III este constituită dintr-un singur lanț polipeptidic, cu histidină terminală. Mecanismul de inactivare al trombinei prin complexul AT-III-heparină constă în formarea unei asocieri ireversibile între o moleculă de trombină și una de AT-III (legătura are loc între centrul activ serină al trombinei și centrul activat arginină al AT-III) (activarea este produsă de heparină, care se prinde pe molecula de AT-III pe un situs de lizină) (fig. XIV.21).

Deficitul de AT-III poate fi congenital, sau dobândit. Deficitul congenital relativ rar (1 : 5 000) se transmite autosomal dominant și a fost descris în familii, fie cu scădere de AT-III, fie cu deficit funcțional de AT-III. La majoritatea bolnavilor, activitatea AT-III era scăzută (50%—30%). Manifestările clinice sunt reprezentate de episoade trombotice și embolii pulmonare, apărute la tineri, cu evoluție gravă și cu caracter familial. La acești bolnavi, sensibilitatea la tratamentul cu heparină este mult redusă și de aceea se asociază obligator antivitamina K_1.

Deficitul dobândit de AT-III, mai frecvent, a fost observat în diferite afecțiuni și este produs prin următoarele mecanisme (Hiller, Riess):

a) Tulburarea sintezei, întâlnită în intoxicațiile cu fosfor și în cirozele hepatice. În acestea din urmă, o hemoragie prin varice esofagiene poate asocia la sinteza deficitară de AT-III și un consum sporit al acesteia, ducând la scăderi importante (30%) ale nivelului de AT-III.

b) Pierderi din compartimentul intravascular, observate în sindroamele nefrotice cu proteinurii mari, în cursul cărora trombozele venelor profunde ale gambelor și emboliile pulmonare se întâlnesc frecvent.

c) Consum crescut: după intervenții chirurgicale mari (cele pentru neoplasme), după folosirea îndelungată a contraceptivelor și după tratamente îndelungate cu doze mari de heparină în cazurile de tromboze venoase.

d) Mecanism complex: în septicemiile cu germeni Gram-negativ sau Gram-pozitiv, care mai întotdeauna se complică cu sindrom CID. În aceste cazuri, scăderea de AT-III poate avea trei cauze: consum crescut datorat neutralizării cantității de trombină în exces, pierderi din compartimentul intravascular, datorate permeabilității capilare crescute și sinteză deficitară datorată leziunilor hepatice toxice.

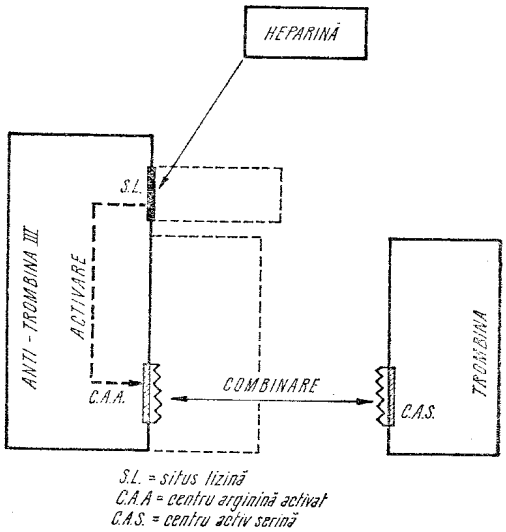


Fig. XIV.21. — Mecanismul de inactivare a trombinei.

— Antitrombina VI corespunde produșilor de degradare ai fibrinei sau/și fibrinogenului. Aceștia apar ca urmare a activității sistemului fibrinolitic; din punct de vedere chimic sunt 4 peptide: 2 cu moleculă mare (X, Y) și 2 cu moleculă mică (D, E) (fig. XIV.22).

Acțiunea produșilor X și Y se exercită asupra monomerilor de fibrină, cu capetele active ale cărora se cuplează, blocându-le capacitatea de polimerizare și împiedicând astfel formarea cheagului. Deși ei nu intervin în prima fază a reacției trombină-fibrinogen (neavând o acțiune directă, nici asupra trombinei, nici asupra fibrinogenului), ci numai în faza a doua (de polimerizare), pe care o blochează, faptul că împiedică finalizarea transformării fibrinogenului în fibrină a făcut să fie asimilați cu niște antitrombine. D și E inhibă aderarea și agregarea plachetară.

— Proteina C a fost pentru prima oară pusă în evidență de Seegers (1960), care a numit-o autoprotrombina IIA. Ea a fost izolată de Stenflo (1970) din plasma de bou și de Kiesel (1979), din plasma de om. Este o glico-proteină cu G.M.=62 000 d constituită din 2 lanțuri peptidice: greu (41 000 d) și ușor (21 000 d) și se află în plasma omului normal în concentrație de 1 U/ml (4 μg). Durata de semiviață este de 4 ore. Nu se consumă în procesul de coagulare a sângelui. Sinteza ei are loc în hepatocite, este vitamina K_1 — dependentă și se desfășoară după un cod gene-

tic aflat pe o pereche de cromosomi somatici; transmisia genetică este autosomal dominantă. Heterozigoții afectați au un nivel plasmatic de 40 U/100; homozigoții numai 15 U/100. Acțiunea fiziologică a proteinei C se exercită atât asupra coagulării plasmei, cât și asupra fibrinolizei (fig. XIV.23). În cadrul coagulării are o dublă acțiune, de inactivare: blochează acțiunea fracțiunii II a moleculei de protrombină, care protejează trombina de activitatea AT-III; inactivează, în prezența de Ca^{++}, fosfolipoid și proteina S (cofactor sintetizat în ficat tot printr-un proces de vitamină K_1 — dependent), factorii $V_{(a)}$ și $VIII_{(a)}$ din calea intrinsecă a coa-

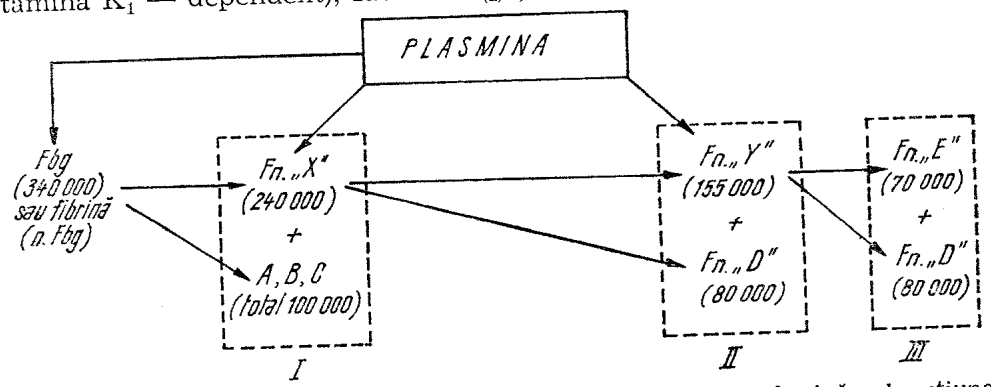


Fig. XIV.22. — Formarea FDP din molecula de fibrinogen sau fibrină sub acțiunea **plasminei.**

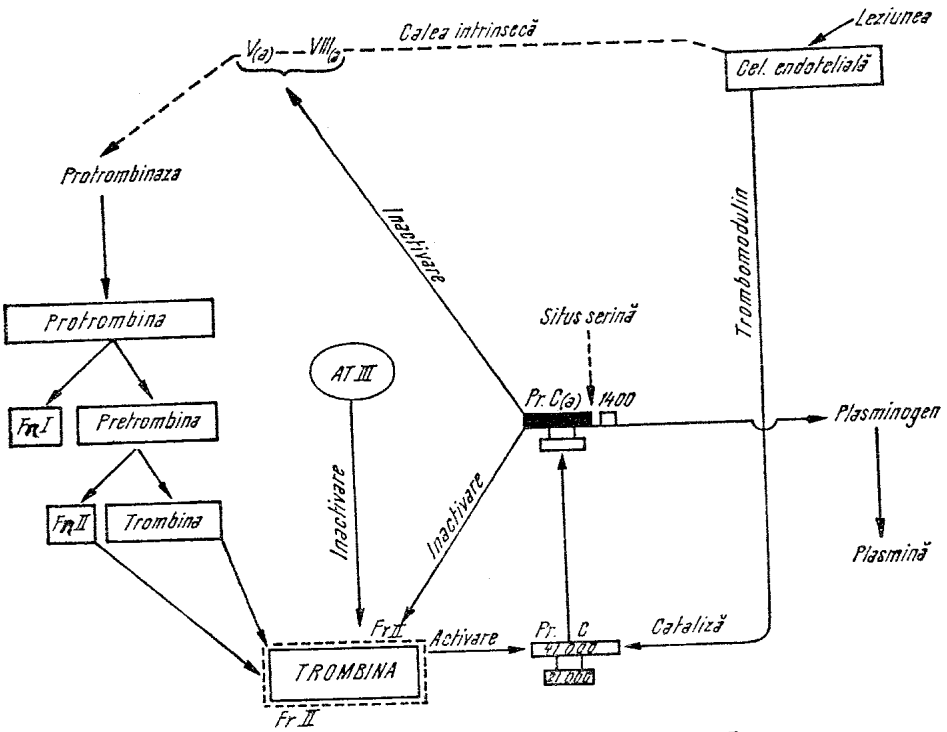


Fig. XIV.23. — Acțiunile proteinei C.

gulării. În cadrul fibrinolizei produce activarea plasminogenului în plasmină. Acțiunea proteinei C este astfel antitrombinică și profibrinolitică. Aceste acțiuni au loc numai după ce proteina C trece în stare activă. Activarea este efectuată de trombină numai în prezența unui cofactor catalitic (trombomodulin) liberat din celulele endoteliale lezate. Se clivează din molecula de proteină C (din lanțul greu) o mică peptidă de 1 400 d, ceea ce face accesibil situsul activ, care este un reziduu de serină. Proteina C este inactivată în plasmă de heparină. Ea poate fi determinată cantitativ printr-un test ELISA.

Dereglarea activității proteinei C în sensul hipereficienței duce la apariția de sindrom hemoragic; deficiența ei produce sindrom trombotic. Niveluri crescute de activitate a proteinei C se întâlnesc în afecțiunile care lezează capilarele acut și pe suprafețe întinse; niveluri scăzute se întâlnesc în deficite congenitale și dobândite din deficiențele hepatice, CID și în terapia severă cu AVK_1.

b) *Antifactorii* sunt inhibitori patologici, ce iau naștere prin mecanisme imunologice. Un exemplu ilustrativ este antifactorul VIII sau IX, ce apare la hemofilicii A sau B, ca urmare a unui mare număr de transfuzii pe o durată lungă de timp, cu concentrate plasmatice de FVIII sau FIX. Au mai fost puși rareori în evidență antifactori împotriva: tromboplastinei tisulare (FIII), FXI, FXII, FXIII. Fiind vorba de anticorpi, acțiunea lor este specifică, îndreptată strict numai împotriva factorului respectiv, pe care-l neutralizează total, blocându-i orice activitate procoagulantă.

La omul normal, activitatea sistemului inhibitorilor coagulării se desfășoară în cel mai perfect anonimat biologic și clinic și poate și pentru acest motiv a fost descoperită și studiată mult mai târziu. În cazurile patologice însă, atunci când deficitul unuia sau al mai multor factori ai coagulării diminuează viteza și eficiența formării trombinei, sistemul anticoagulanților devine preponderent, ceea ce are ca urmare o coagulare foarte lentă și calitativ imperfectă; cheagul format este incapabil să asigure o hemostază eficace, fapt ce duce la exprimarea clinică a deficienței respective, sub forma unui sindrom hemoragic.

*

Mecanismul complex al coagulării, așa cum a fost prezentat, este cunoscut grație unor multiple și minuțioase investigații de laborator efectuate *in vitro* (22). Numeroase argumente experimentale și clinice indică oarecare deosebiri ale mecanismului *in vivo* care nu sunt însă fundamentale.

Astfel, distincția între calea intrinsecă și cea extrinsecă, care la testele efectuate *in vitro* este atât de netă, se șterge de îndată ce este studiată *in vivo*. Exemple:

— deficitul în FXII, care la testele de laborator revelează evidente anomalii ale coagulării, nu provoacă nici un sindrom hemoragic (pacientul Hageman, care a dat numele FXII și deficitului său, a murit prin accident tromboembolic);

— deficitul de FVII se obiectivează *in vitro* prin perturbări minore ale testelor de coagulare, pe când în clinică se exprimă printr-un sindrom hemoragic grav.

Este absolut necesar să se aibă în vedere aceste fapte, pentru transpunerea la bolnav fără eroare a datelor obținute din investigația sângelui său în laborator.

În cadrul hemostazei, mai ales, dar și al fibrinolizei, un rol deosebit, ce este necesar să fie amintit, aparține endoteliului vascular. *Endoteliul vascular*, ale cărui multiple activități au fost demonstrate mai ales în ultimul timp, intervine prin numeroase substanțe și acțiuni în mai multe momente ale hemostazei și fibrinolizei.

Celulele endoteliale vasculare produc, prelucrează, liberează și resorb o serie de substanțe vasoactive, factori relaxanți și constrictori vasculari, prostaglandine, adeninnucleotide, unii factori și substanțe ale coagulării și fibrinolizei. Prin toate aceste multiple produse pe care le elaborează, endoteliul vascular începe să fie considerat ca un organ endocrin (Walter).

Din principalele substanțe ce participă la hemostază și fibrinoliză pot fi menționate următoarele:

— EDRF *(endothelium derived relaxing factor)*. Identificat recent cu oxidul de azot, NO, el relaxează fibrele musculare parietale și produce vasodilatație, dar este și citotoxic și bactericid. Secreția sa de către celula endotelială este crescută prin trombină, bradikinină ș.a. Când într-o arteră cu endoteliu normal se produce o agregare plachetară cu activarea cascadei coagulării, trombina și produse plachetare (în special serotonină, ADP și ATP) provoacă o eliberare imediată de NO. Vasodilatația produsă de acesta împinge distal trombusul pe cale de formare, mai înainte ca el să pericliteze circulația. NO are și o acțiune antiadezivă și antiagregantă plachetară. Prin proprietățile sale NO contribuie considerabil la acțiunile anticoagulante ale endoteliului. Recent s-a constatat că există diferențe locale în ce privește capacitatea endoteliului de a produce NO, de exemplu între artere și vene, diferențe care pot influența acțiunea endoteliului în prevenirea unei coagulări intravasculare. În caz de leziune cu efracție a unui vas, la nivelul respectiv nu se mai produce și liberează NO și prostaciclină (considerată și ea ca un EDRF) și apare o vasoconstricție mediată de EDCR care nu mai este antagonizată ca în condiții fiziologice de NO.

— EDCF *(endothelium derived contracting factor)* produce împreună cu mediatorii sistemului local renină-angiotensină și cu endotelina o vasoconstricție care participă la faza timpurie a hemostazei. Vasoconstricția produsă de EDCF poate deveni importantă în condiții acute (hipoxie acută) sau cronice (hipertensiune, ateroscleroză).

— Endotelină, peptid cu acțiune vasoconstrictoare.

— Angiotensină II și ACE *(angiotensin converting enzyme)*, ambele cu acțiune vasoconstrictoare.

— Prostaciclină (PGI_2) cu acțiune vasodilatatoare și antiagregantă plachetară.

— Adenozină, cu acțiuni similare.

— Factorul von Willebrand (FvW). Celula endotelială este principala sa sursă de sinteză și îl depozitează în membrana bazală. Această formă matriceală a FvW, factor care este o moleculă neobișnuit de adezivă, este importantă pentru adeziunea inițială a plachetelor în cazul

unei leziuni vasculare, el fiind responsabil pentru 40% din adeziunea totală a plachetelor care are loc în prezența Ca^{++}. Totodată el fixează și FVIII. În celula endotelială FvW este depozitat în granule specifice, corpii Weibel-Palade; secreția sa din aceștia este polarizată, cu 90% dirijare spre subendoteliu. Activarea celulei endoteliale prin trombină, IL-1 și FNT (factor de necroză tumorală) provoacă o secreție imediată de FvW, dar în acest caz nu se mai produce o secreție de FvW din corpii Weibel-Palade. În sânge FvW se găsește în două compartimente distincte: unul plasmatic, sintetizat și eliberat de celula endotelială și altul, FvW, sintetizat de megakariocite și care circulă în plachete, în care este depozitat în granulele α.

— Trombomodulina, liberată de celula endotelială, este o proteină ce se servește ca receptor pentru trombină, care pe această cale activează proteina C, inhibitor activ al coagulării.

— Tromboplastină.

— Antitrombină III.

— Activator tisular al plasminogenului, care este activatorul primar al fibrinolizei intravasculare.

— Lizokinaze sau activatori indirecți ai fibrinolizei.

— Inhibitor al lizei cheagului.

Celula endotelială exprimă la suprafață receptori pentru o serie de factori ai coagulării ca: protrombină, FVa, FIXa, FX, astfel încât când este inițiată coagularea, ea poate fi amplificată pe suprafața celulelor endoteliale.

Celulele endoteliale exprimă și unele imunoglobuline, cum este PECAM-1, moleculă activă de adeziune ce necesită prezența magneziului.

Mai merită amintit faptul că celulele endoteliale conțin pe suprafața lor luminală cantități mari de heparan sulfat, un glicozaminoglican pe care se fixează cu mare afinitate antitrombina III, realizându-se un mecanism rapid și puternic de inhibare a factorilor coagulării activați.

Endoteliul vascular participă așadar atât la hemostază prin reglarea coagulării, cât și la fibrinoliză.

În reglarea coagulării, endoteliul poate acționa în două sensuri opuse: a) prevenirea și inhibarea coagulării, în condiții fiziologice, prin vasodilatare și producere de substanțe (NO, adenozină, prostaciclină) ce se opun adeziunii, agregării și secreției de către plachete a unor compuși ce participă la coagulare, acțiuni ce ajută la menținerea permeabilității vaselor sanguine; b) activarea coagulării, în cazul apariției unei leziuni (efracții) vasculare care dezgolește matricea extracelulară subendotelială, în care fibronectina și mai ales colagenul fibrilar constituie agenți trombogenici prin care se declanșează calea extrinsecă a coagulării. Receptorii exprimați pe celulele endoteliale pentru protrombină și FX intensifică coagularea pe suprafața endoteliului. În reglarea fibrinolizei, endoteliul intervine prin lizokinaze și inhibitorul lizei cheagului, inițiind degradarea cheagului de fibrină.

Rolul endoteliului vascular în hemostază și fibrinoliză apare cu atât mai important pentru practică cu cât alterarea anatomică sau biochimică a sa constituie cea mai frecventă cauză a trombozelor patologice.

FIBRINOLIZA

Fibrinoliza s-a separat mai târziu din cadrul hemostazei, fiind considerată un fenomen independent, deşi acţiunea sa se desfăşoară în cea mai strânsă corelaţie cu cea a hemostazei. Interesul cercetărilor asupra fibrinolizei a crescut progresiv, pe măsură ce s-a întrevăzut posibilitatea transpunerii în practică a datelor teoretice obţinute din studiile asupra celor două fenomene. Aşa cum pentru o terapeutică eficientă a sindroamelor hemoragice este necesară o bună cunoaştere a mecanismului hemostazei, în aceeaşi măsură este indispensabilă cunoaşterea mecanismului fibrinolizei, atât pentru combaterea sindroamelor fibrinolitice, cât şi pentru tratamentul trombolitic al trombozelor.

Mecanismul fibrinolizei. Fibrinoliza poate fi definită ca desfacerea enzimatică a fibrinei în fragmente, ce nu mai sunt capabile să formeze o reţea coerentă. Termenul este folosit atât pentru desemnarea dispariţiei vizibile a reţelei de fibrină (uşor de urmărit cu ochiul liber), cât şi în ceea ce priveşte discretele exacerbări de activitate ale sistemului, care nu pot fi determinate decât cu metode sensibile de laborator. În afara acţiunii principale de dizolvare a cheagurilor formate în circulaţie, fibrinoliza mai intervine şi în curăţirea exsudatelor fibrinoase inflamatorii din ţesuturi şi asigurarea permeabilităţii permanente a arterelor.

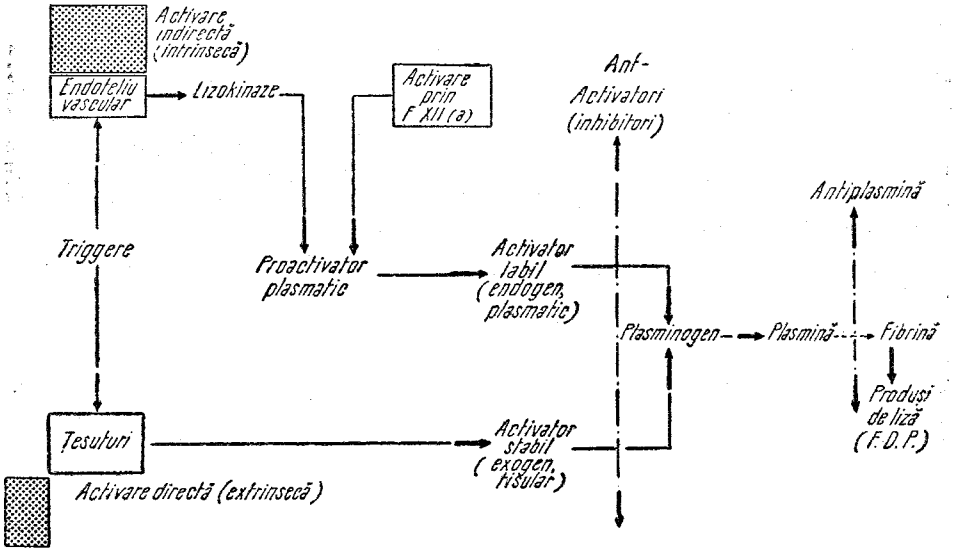


Fig. XIV.24. — Mecanismul fibrinolizei.

Sistemul fibrinolitic apare mult mai puţin complicat decât cel al hemostazei (fig. XIV.24). El posedă 2 căi de activare: directă şi indirectă. În structura sa cuprinde două grupe de substanţe, care se găsesc prezente în mod normal în ţesuturi sau în plasmă. 1) Primul grup, al activatorilor produs al ţesuturilor, cuprinde două feluri de substanţe: lizokinaze sau activatori indirecţi (cu sediul în endoteliul vascular) şi activa-

tori tisulari, stabili sau direcți (cu sediul în granulele lizosomale din celulele tuturor țesuturilor). Această descoperire aparține lui Astrup, care, grație tehnicii care-i poartă numele (plăcile de fibrină Astrup), a arătat că țesuturile nu posedă activitate fibrinolitică proprie, ci numai proprietatea de a activa plasminogenul (pe plăcile încălzite în prealabil, liza fibrinei nu mai are loc). Repartizarea activatorilor tisulari este diferită în funcție de organul considerat. S-a putut măsura nivelul activatorilor dintr-un țesut și raporta la gramul de organ proaspăt (tabelul 14.III).

TABELUL 14.III

Conținutul în activatori tisulari al organelor umane

1. Organe cu nivel înalt (peste 300 u/g)	uter	720
	suprarenală	410
	ganglion limfatic	378
	prostată, pancreas	334
	tiroidă	325
2. Organe cu nivel mediu (100—250 u/g)	plămân	223
	ovar	210
	hipofiză	140
	rinichi	119
	mușchi	110
3. Organe cu nivel scăzut (sub 100 u/g)	cord	82
	creier	35
	testicul	25
	splină	20
	ficat	0

2) Al doilea grup cuprinde proactivatorul plasmatic și plasminogenul, substanțe aflate în plasmă, în stare inactivă ca precursori sau proenzime.

Plasminogenul este o β-globulină cu un singur lanț polipeptidic (790 aminoacizi), a cărei concentrație în plasma normală este de 0,1—0,2 mg/ml; el se mai află și în alte umori, ca lichidul sinovial. Este sintetizat în ficat și eozinofilele din măduva hematogenă. Constanta sa de sedimentare S_{20} este de 4,1. Greutatea sa moleculară este de 92 000 d. Există două tipuri moleculare de plasminogen: tipul nativ cu G.M. 92 000 d, aflat normal în circulație, al cărui lanț peptidic începe cu glutamina și se termină cu asparagina și care se numește „Glu-plasminogen" și un tip aparte cu G.M. 86 000 d (rezultant al acțiunii plasmei asupra Glu-plasminogenului), al cărui lanț peptidic începe cu lizina și se termină tot cu asparagina; el se numește „Lys-plasminogen" (fig. XIV.25).

Pe molecula de plasminogen se află situsuri speciale pentru fibrinogen, denumite LBS *(lysine binding sites)*, grație cărora cele 2 substanțe circulă în plasmă împreună. Când sub influența activatorilor fibirinolitici, plasminogenul este transformat în plasmină, aceasta se află gata așezată pe substratul de liză. Dacă între timp acesta a fost transformat în fibrină, are loc o fibrinoliză; dacă coagularea nu s-a produs, are loc o fibrinogenoliză.

Din acțiunea selectivă a primului grup asupra celui de-al doilea, adică prin așa-numita activare (fie directă, fie indirectă), ia naștere din

plasminogen o puternică enzimă proteolitică, plasmina, care digeră nu numai fibrina, ci și caseina și alte substanțe proteice (fibrinogen, FV, FVIII și AT-III), având o acțiune selectivă pentru prima.

Activarea plasminogenului în plasmină constă în ruperea lanțului polipeptidic în 2 subunități legate prin punți disulfidice. Ea se desfășoară astfel (vezi fig. XIV.25): din molecula plasminogenului se clivează o pro-

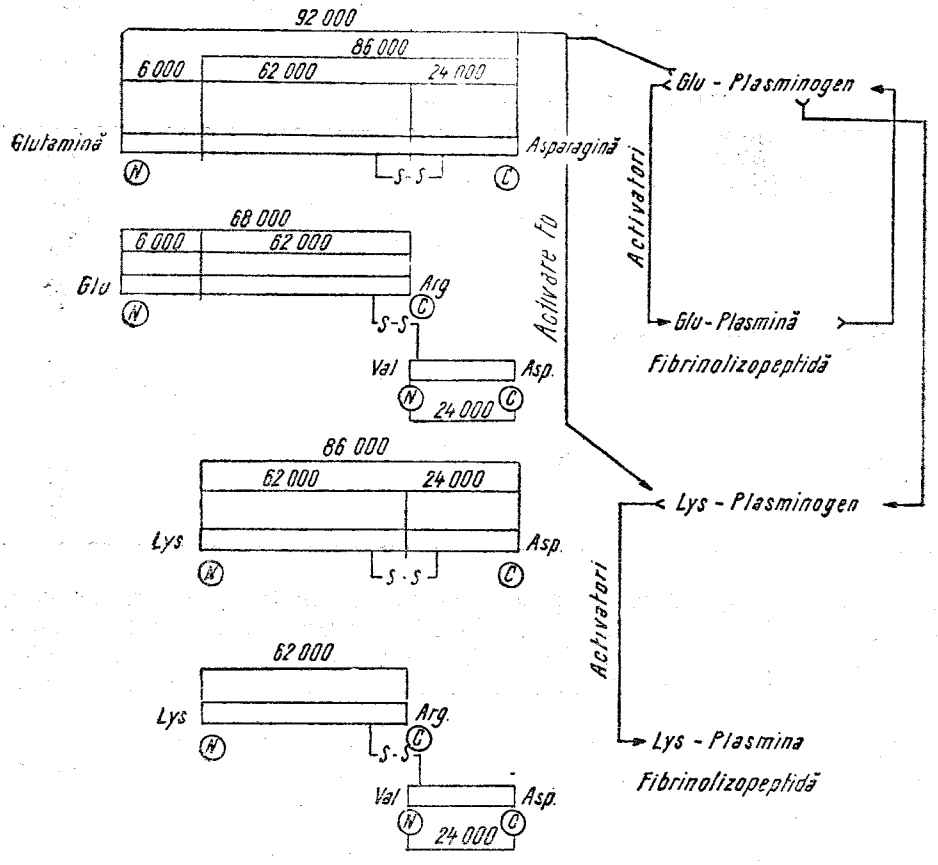


Fig. XIV.25. — Structura schematică a moleculelor de plasminogen și plasmină; interdependența lor în procesul de activare.

teină cu G.M. 24 000 d, denumită fibrinolizopeptidă; lanțul ei peptidic începe cu valina și se sfârșește cu asparagina. Clivajul are loc prin ruperea unei legături arginină-valină. Molecula mare rămasă este plasmina; ea este de 2 feluri: Glu-plasmină și Lys-plasmină, după cum a provenit din Glu-plasminogen, respectiv Lys-plasminogen. Prima are G.M. 68 000 d (lanț glutamină-arginină); a doua are G.M. 62 000 d (lanț lizină-arginină).

Acest proces de activare are 2 căi diferite, după cum se petrece în plasmă (în absența fibrinei) sau în ser (în prezența fibrinei). În plasmă, traseul este: Glu-plasminogen ⟶ Glu-plasmină ⟶ Glu-plasminogen

⟶ Lys-plasminogen ⟶ Lys-plasmină. În ser, traseul este: Glu-plasminogen ⟶ Lys-plasminogen ⟶ Lys-plasmină. Calea serică este de 20 de ori mai rapidă decât cea plasmatică.

În calea de *activare directă*, activatorii tisulari sau stabili acționează nemijlocit asupra plasminogenului și îl activează în plasmină. *Activarea indirectă* are două trepte: în prima treaptă lizokinazele acționează asupra proactivatorului plasmatic, activându-l în activator labil; în a doua treaptă, activatorul labil activează plasminogenul în plasmină. Cât privește acțiunea plasminei asupra fibrinei, ea are ca efect macroscopic dispariția cheagului, iar ca mecanism intim digestia proteolitică a fibrinei în peptide (FDP=produși de degradare a fibrinei), solubile, cu moleculă mică și care au pierdut orice posibilitate de a mai forma rețele coerente, dar au căpătat în schimb proprietăți anticoagulante. Acțiunea litică a plasminei se exercită asupra fibrinei sau Fbg în 3 etape, dând naștere FDP-urilor după cum urmează (fig. XIV.22);

a) *Etapa 1:* din lanțurile α clivează 2 segmente a 45 000 d fiecare, iar din lanțurile β 2 segmente a 5 000 d fiecare; rămâne un fragment mare de 240 000 d, denumit „X".

b) *Etapa a 2-a:* se clivează din fragmentul „X" un segment de 80 000 d denumit „D", rămânând fragmentul „Y" de 155 000 d.

c) *Etapa a 3-a:* fragmentul Y este clivat în 2 fragmente mai mici: „E" (70 000 d) și „D" (80 000 d).

Așadar, dintr-o moleculă de fibrinogen, rezultă următoarele molecule de FDP: X, Y, E și 2D. Dintr-o fibră de fibrină rezultă un multiplu (n) al acelorași tipuri de FDP. Durata de semiviață a FDP în circulație este de 10 ore. Din punct de vedere al activității lor, FDP cu moleculă mare (X, Y) împiedică polimerizarea monomerilor de fibrină; în prezența etanolului 50% sau a sulfatului de protamină, ele dau naștere fenomenului de „paracoagulare". FDP cu moleculă mică (D, E) inhibă fenomenul de aderare și pe cel de agregare plachetară.

Mai trebuie adăugat faptul că punerea în mișcare a acestui sistem se face indiferent de cadrul fiziologic sau patologic, în momentul eliberării kinazelor din țesuturi, eliberare care are loc în anumite situații și este datorită unei game variate de stimuli, pe care autorii de limbă engleză îi denumesc plastic „trigger" (trăgaciul unei arme de foc) (fig. XIV.26).

*

Ceea ce s-a prezentat până aici nu reprezintă decât una din laturile acestui sistem, cea profibrinolitică; ca în orice sistem biologic, organismul dispune și de o a doua latură, cea *antifibrinolitică*, care se opune acțiunii primei. Aceasta este compusă din mai multe grupe de substanțe: endogene și exogene: antiactivatori (blochează activarea) și inhibitori plasminici (se opun acțiunii plasminei) (fig. XIV.24).

Antiactivatorii sunt fiziologici sau *endogeni*, dar există și antiactivatori *exogeni*, substanțe preparate în laborator, în scop terapeutic, pentru a combate sindromul fibrinolitic. Acestea sunt trei: acidul epsilon-amino-caproic (EACA), acidul amino-metil-hexan-carboxilic (AMCHA) și acidul tranexamic (ciclokapron).

Inhibitorii plasminici endogeni sunt cele 2 antiplasmine fiziologice: α_1 și α_2. Activitatea lor în toată plasma normală este de 10 ori mai mare decât a plasminei care s-ar naște în cazul activării întregii cantități a plasminogenului. Dintre cele 2 antiplasmine, α_1 realizează 25% din activitatea inhibitorie; ea frenează adsorbția plasminei pe fibrină și fibrinogen. α_2 realizează 75% din activitatea inhibitorie; ea se combină 1/1 cu

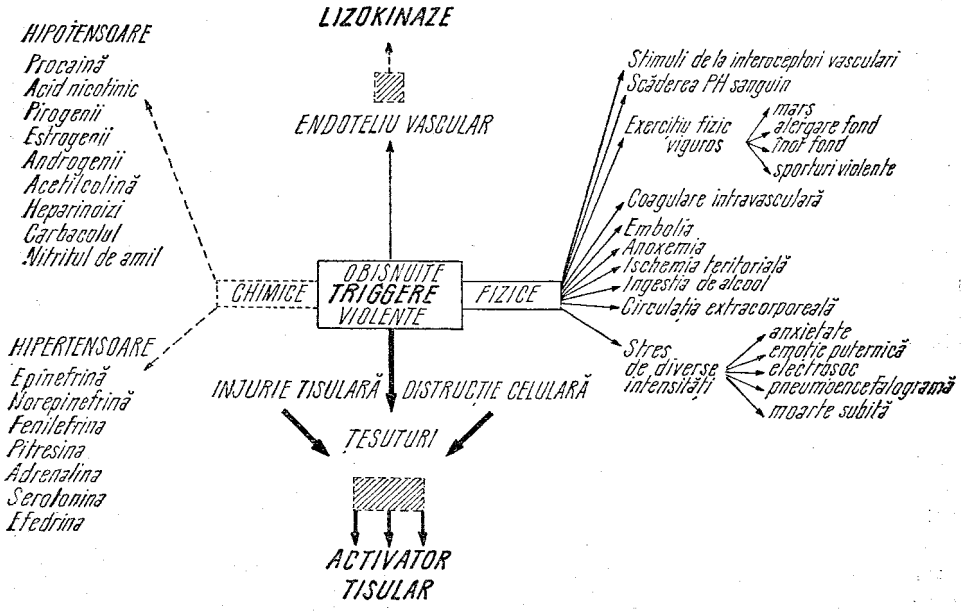


Fig. XIV.26. — Declanșatori ai fibrinolizei.

plasmina, formând un complex inactiv. Ea are o greutate moleculară de 70 000 d și o concentrație plasmatică de 60 mg/l. Inhibitorii *exogeni* ai plasminei sunt doi: inhibitorul lui Kunitz (pancreatic), comercializat sub numele de Iniprol și inhibitorul lui Frey (parotide și plămâni), comercializat ca Trasylol și Zimofren.

Fibrinoliza fiziologică (tromboliza). Sângele uman normal dezvoltă o activitate fibrinolitică fiziologică, pe care o folosește în mod curent pentru liza cheagurilor și peliculelor de fibrină, care se formează continuu în arborele vascular prin activitatea normală a sistemului hemostatic sanguin.

Viteza de circulație a sângelui influențează negativ această activitate fibrinolitică. Astfel se explică de ce în microcirculație nivelul activității fibrinolitice este mult mai mare decât în circulația generală, fapt care condiționează importantul rol fiziologic de menținere în permanență liberă a căilor patului capilar. Variațiile fiziologice ale activității fibrinolitice sunt următoarele: *creștere* — după efort fizic, prin hiperventilație și în timpul zilei; *scădere* — la făt și nou-născut, în sarcină, după instalarea menopauzei.

Activitatea fibrinolitică naturală sau fiziologică a fost denumită trombolitică, înțelegându-se prin acest termen un fenomen local, prin care un trombus sau orice altă formație fibrinoasă sunt lizați prin acțiunea plasminei; termenul de fibrinoliză implică un proces extins, general, ce cuprinde întreaga sau cea mai mare parte a sângelui circulant. După Sherry, tromboliza este varianta fiziologică a activității fibrinolitice.

Studii flebografice arată că, într-un interval relativ scurt de timp, în vasele proaspăt obstruate de trombi, se produce o recanalizare și că, în acel moment, materialul trombotic a dispărut în mod spontan. Pe de altă parte, studiile histologice efectuate pe trombi umani, recoltați în diferite necropsii, au arătat că aceștia prezentau toți fenomene de dezintegrare mai intense în centrul lor, descrescând spre periferie. Pe această bază, s-a conchis că formarea unui trombus intravascular produce o creștere a activității fibrinolitice locale, creând astfel condiții pentru lizarea acestui trombus.

Mason—Guest, pe bază de cercetări microreologice cu tahicinematografie, afirmă că rolul trombolizei este neîndoielnic lichidarea produsului microcoagulării intravasculare, după ce aceasta și-a îndeplinit funcția. Este vorba de un proces continuu de microcoagulare, iar nivelul constant moderat al activității trombolitice permite reîmprospătarea continuă a peliculei endoteliale de fibrină protectoare de pe intima vaselor (vezi fig. XIV.3) sau chiar repermeabilizează mici vase obstruate. Totul se produce în teritorii de microcirculație, fără nici un răsunet în circulația generală. După Mason—Guest, tromboliza este fibrinoliza fiziologică locală răspunzătoare de menținerea liberă a microcirculației.

În ceea ce privește mecanismul intim al trombolizei (producerea lizei depozitelor de fibrină), este știut că din punct de vedere chimic, *in vitro*, plasmina digeră la fel de bine și de repede fibrina, fibrinogenul și unii factori ai coagulării (FV și FVIII-c). Cum se realizează însă tromboliza *in vivo*, fără ca plasmina să apară liberă în circulație? Cu alte cuvinte, cum se lizează numai ceea ce trebuie lizat, protejându-se proteinele ce constituie cei mai importanți factori ai coagulării? Ipoteza lui Sherry (1965) caută să explice acest fenomen (fig. XIV.27). Plasminogenul și proactivatorul sunt încarcerați în interiorul cheagului de fibrină în momentul formării acestuia, pentru că în circulație ei sunt adsorbiți pe moleculele de fibrinogen.

Prezența pe endoteliul vascular a unui depozit de fibrină (fie peliculă, fie trombus) reprezintă pentru acesta un stimul fizic și posibil și chimic (Warren). El răspunde mai întâi prin eliberarea de lizokinază și apoi și de activatori tisulari, în funcție de intensitatea excitației. Lizokinazele și activatorii eliberați de endoteliul vascular pătrund în cheag prin difuziune și realizează local o suficient de mare concentrație, pentru a trece proactivatorul în activator și apoi plasminogenul în plasmină. Aceasta începe imediat liza texturii de fibrină a cheagului. Antiplasmina α_2 se află în afara cheagului, liberă în circulație; rolul ei este de a neutraliza orice cantitate de plasmină, ce eventual ar ieși din interiorul cheagului, atunci când acesta începe să fie lizat. Tot ea neutralizează eventuala plasmină care s-ar forma dacă ar pătrunde activator tisular în circulație (care poate activa plasminogenul din sânge). Această ipoteză ex-

plică activitatea trombolitică concomitentă cu cruţarea factorilor plasmatici ai coagulării şi cu coexistenţa în plasmă de plasminogen neactivat şi de apreciabile cantităţi de antiplasmină.

Un fapt reiese ca esenţial în mecanismul trombolizei: capacitatea cheagului de a încorpora pe unii din componenţii sistemului fibrinolitic (plasmină şi plasminogen, activatorul său şi proactivatorul plasmatic) şi inerţia sa faţă de componenţii sistemului antibrinolitic (antiactivator şi antiplasmină). Acest comportament selectiv reprezintă cheia de boltă a

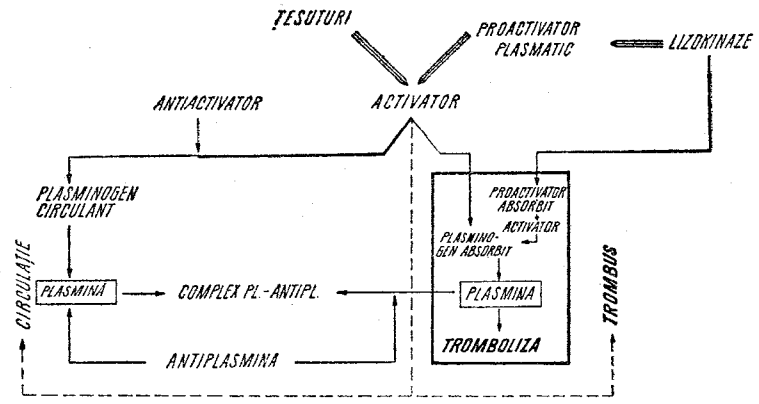


Fig. XIV.27. — Tromboliza (după S. Sherry).

trombolizei şi linia de graniţă între fiziologic şi patologic în acest domeniu. Graţie lui, plasmina poate liza bine şi repede cheagul, în tot acest timp fibrinogenul plasmatic rămânând protejat (Fearnley). Acest fapt evidenţiază un principiu biologic de mare semnificaţie, şi anume că unei enzime, care *in vitro* beneficiază de un spectru destul de larg de activitate proteolitică, i se poate îngrădi *in vivo* activitatea de aşa manieră, încât să i se anuleze complet posibilitatea de a o manifesta în circulaţia generală, limitându-i-se local activitatea la un singur substrat, în cazul de faţă fibrina trombusului. Fenomenul de adsorbţie exercitat de cheag asupra unor componenţi principali ai sistemului fibrinolitic permite aşadar atât realizarea de concentraţii ridicate ale acestora într-un volum restrâns (ceea ce le conferă o activitate ridicată), cât şi protecţia lor de atacul inhibitorilor care circulă în sânge. Graţie acestui ingenios mecanism, factorii prolitici efectuează liza cheagului chiar în prezenţa celor antilitici, fără ca aceştia să-i poată împiedica (Ratnoff).

Se poate conchide că nivelul fiziologic al fibrinolizei este reprezentat de tromboliză, mecanism fibrinolitic de tip special, de desfăşurare strict locală, fără nici un răsunet general. Numai când se depăşesc graniţele fiziologice are loc o exacerbare a întregului sistem litic, cu activarea plasminogenului în circulaţie şi cu apariţia hiperplasminemiei (care depăşeşte posibilităţile de neutralizare ale sistemului antifibrinolitic); efectul acestei perturbări este instalarea sindromului fibrinolitic acut, tip de activare cataclismică, caracteristică aspectului patologic al fibrinolizei.

Fibrinoliza patologică (24). Reacții fibrinolitice anormale apar într-o mare varietate de condiții clinice. Ele îmbracă aspecte foarte variate, mergând de la simpla tulburare, clinic mută, decelabilă printr-un examen de laborator, până la sindromul hemoragic prin fibrinoliză acută, a cărui gravitate poate fi extremă.

Fibrinoliza patologică nu apare decât în două circumstanțe: *a)* ca o consecință directă a unei activități foarte crescute a sistemului fibrinolitic, apărută primordial și cu așa intensitate încât forțează toate barierele reprezentate de sistemul inhibitorilor (fibrinoliza primară); *b)* ca urmare a unei coagulări intravasculare diseminate, care în mod secundar duce la creșterea compensatoare, dar peste măsură de amplă a activității sistemului fibrinolitic (fibrinoliza secundară) (Fletcher).

Fie că este vorba de o fibrinoliză primară sau de una secundară, factorul esențial comun ambelor, este hiperplasminemia. Plasmina liberă în circulație lizează fibrinogenul, factorul V și factorul VIII-c, producând o adevărată defibrinare *in vivo*. În fibrinoliza primară, defibrinarea este consecința strictă a acțiunii litice a plasminei, în timp ce în fibrinoliza secundară ea rezultă din acțiunea conjugată a coagulării intravasculare (care are ca urmare un apreciabil consum de fibrinogen și factori plasmatici) cu acțiunea litică a plasminei. Și într-un caz și în celălalt, defibrinarea are ca urmare un nivel de hipocoagulabilitate sanguină atât de scă-

TABELUL 14.IV

Stări fibrinolitice patologice

Obstetricale	— sindromul hemoragic al gravidelor	în ultimele luni de sarcină abrupția placentei
	— embolismul amniotic	făt mort molă hidatiformă
Chirurgicale	— intervențiile operatorii largi și laborioase — intervențiile pe prostată și pe pancreas — circulația extracorporală	
Medicale	— ciroza hepatică — boala Miyasato — leucemiile — mușcătură de șarpe veninos	
Cu implicație generală	— transfuzia de sânge incompatibil — terapia fibrinolitică — moartea subită	

zut, încât orice situație care ar putea în mod obișnuit declanșa o anodină hemoragie, devine cauza unui sindrom hemoragic deosebit de grav.

Alți autori (Moulinier) împart sindroamele fibrinolitice acute în patru mari clase: obstetricale, chirurgicale, medicale și cu implicație generală (tabelul 14.IV).

a) *Fibrinolizele obstetricale* au la bază un mecanism dublu: coagulare intravasculară, urmată de fibrinoliză secundară. Sindromul hemoragic

din ultimele luni ale sarcinii, ca și cel rezultat din abrupția placentei se datoresc pătrunderii în circulație a tromboplastinei de la nivelul unei efracții placentare; se produce o coagulare intravasculară diseminată, urmată de fibrinoliză secundară. Pe de altă parte, tot din placenta lezată pătrund în circulație și activatori, care produc o masivă activare a plasminogenului, cu eliberare explozivă de plasmină și instalarea unei fibrinolize primare. Ambele duc, în ultimă instanță, la un sindrom hemoragic grav. Embolismul amniotic prezintă o situație similară. El poate fi urmarea unui făt mort reținut sau a unei mole hidatiforme.

b) *Fibrinolizele chirurgicale* sunt secundare unor intervenții largi și laborioase care pun în circulație mari cantități de substanțe tromboplastice și activatori tisulari, provocând o defibrinare cu mecanism mixt. Ea va fi cu atât mai gravă, cu cât organul interesat de operație are un conținut bogat în material tromboplastic și litic. Organe mai bogate în activatori ai fibrinolizei ce pot provoca o defibrinare postoperatorie sunt: plămânul, uterul, pancreasul, tiroida. Intervențiile pe prostată sunt urmate uneori de complicații fibrinolitice, care condiționează un grav sindrom hemoragic. În cazurile de adenocarcinom, această complicație este foarte frecventă. Prostata normală este destul de bogată în activatori litici: apariția în sânul ei a unei proliferări maligne multiplică apreciabil producerea acestora. Trecerea lor în circulație (ca urmare a intervenției chirurgicale) dă naștere la o fibrinoliză violentă; sindromul este primar (fibrinoliză pură, neprecedată de o coagulare intravasculară).

În timpul intervențiilor asupra cordului, corpul este irigat de sistemul artificial inimă-plămân; în această circulație, „în afara vaselor", sângele este supus la o serie de mici traume, care au ca efect producerea de microcoagulări (cheagurile se găsesc la finele intervenției pe filtrele aparatului). Ca răspuns, crește și activitatea litică a plasmei, în timp ce nivelul fibrinogenului este coborât sub normal. Câtă vreme aceste tulburări rămân reduse la niveluri mici și medii, nu se produce nici o complicație. Dacă însă contactul cu suprafețele străine este prea îndelungat, injuria tisulară chirurgicală prea amplă, noxa anesteziei și starea de hipoxie prea prelungite, atunci se întâmplă uneori ca, după terminarea operației, să apară un sindrom hemoragic, uneori fatal; aceste cazuri sunt însă rare și cunoașterea lor permite profilaxia de rigoare.

c) *Fibrinolizele medicale:* în *ciroza hepatică* se întâlnesc relativ frecvent niveluri înalte de activitate fibrinolitică, datorate titrului coborât în care se află antiactivatorul și antiplasmina, ambii sintetizați de hepatocite. Acestea favorizează sindromul hemoragic caracteristic acestor bolnavi, datorat sintezei deficiente a unor importanți factori plasmatici ai coagulării: fibrinogenul, protrombina, factorii IX și X (De Nicola).

În literatură sunt comunicate 4 cazuri în care sindromul fibrinolitic cronic al bolnavilor este datorat deficienței constituționale de α_2-antiplasmină (boala Miyasato).

Leucemiile: relativ frecvente cazuri de leucemie acută prezintă fenomene de CID, care complică sindromul hemoragipar, datorită defecțiunilor de hemostază, în care trombopenia severă reprezintă implicația de bază. Formele de leucemie cu cea mai mare frecvență a manifestărilor

de CID sunt cele promielocitare. Cauza lor rezidă în eliberarea de material tromboplastic din elementele anormale.

Mușcătura de șarpe: veninul viperidelor conține pe lângă toxine și enzime cu multiple activități, între care cea coagulantă prezintă o deosebită importanță. Când inocularea veninului nu este urmată de moarte (prin acțiunea toxinelor), coagularea intravasculară combinată cu fibrinoliza secundară duc la instalarea unei defibrinări destul de marcate.

d) *Alte sindroame fibrinolitice.* În afara grupelor de sindroame fibrinolitice prezentate, au mai fost observate sindroame fibrinolitice și în alte situații:

1) *Transfuzia de sânge incompatibil* duce la o hemoliză *in vivo* care pune în libertate (din eritrocitele lezate) substanțe tromboplastice. Urmează un sindrom CID, urmat de fibrinoliză secundară. Această asociere explică apariția unui sindrom de defibrinare prin mecanism mixt, care complică blocajul renal al bolnavului.

2) *Terapia fibrinolitică:* liza indusă *in vivo* prin administrare de activatori (streptokinază sau urokinază) în tratamentul trombozelor, dă naștere uneori la efecte nedorite de activitate litică violentă. Din fericire, înainte de apariția sindromului hemoragic, în aceste cazuri este epuizat plasminogenul plasmatic și nu se ajunge la defibrinare; aceasta, bineînțeles dacă bolnavul este atent urmărit și la primul semn de alarmă se oprește administrarea de activator.

3) *Moartea subită* produce cea mai rapidă și mai completă fibrinoliză; în 45—60 minute de la instalarea ei, se produce coagularea sângelui în tot arborele circulator, urmată de o fibrinoliză secundară generalizată, foarte puternică, care în două ore face ca tot sângele să devină fluid și incoagulabil. În Rusia se folosește acest sânge la transfuzii, cu rezultate bune.

4) *Defibrinarea terapeutică* este un act medical de importanță deosebită în profilaxia accidentelor trombotice la persoanele cu nivel de Fbg plasmatic foarte ridicat. Se bazează în cea mai mare parte pe mecanismul fibrinolitic. Singurul preparat care o poate realiza eficient și fără riscuri este „Ancrod", obținut din veninul „Ankistrodon Rhodostoma" (șarpe asiatic veninos). Preparatul are următoarele acțiuni și implicit calități:

— atacă lanțurile α din molecula de fibrinogen, liberând fibrinopeptide A; monomerii de fibrină rezultați sunt foarte lent polimerizați;

— nu activează FXIII (cum face trombina), încât orice cantitate de fibrină s-ar forma ca urmare a polimerizării monomerilor de fibrină, va fi de tipul „s" (și nu „i") care este de 10 ori mai sensibilă la acțiunea litică a plasminei;

— activează moderat plasminogenul în plasmină; aceasta atacă puțina fibrină „s" rezultată din polimerizarea monomerilor și o digeră până la FDP care blochează imediat capetele monomerilor încă nepolimerizați (cei mai mulți) și le împiedică polimerizarea; ei sunt în continuare lizați de plasmină în FDP.

Aceasta este unica formă de defibrinare care se realizează între limite fiziologice, fără tromboze și leziuni renale (așa cum se întâmplă când se utiliza trombina). Se folosește cu precădere în profilaxia trombozelor postoperatorii, după intervențiile chirurgicale mari, la bolnavii cu fibrinogen

preoperator crescut (se administrează subcunatat de 2 ori pe zi câte o fiolă, timp de 4—5 zile de la operație).

Deficiențele fibrinolizei. În literatura de specialitate sunt extrem de puține cazurile de deficiență constituțională, dar mai frecvente cele de deficiență dobândită a sistemului fibrinolitic în diabet, obezitate, afecțiuni renale și după 48 de ore de la intervențiile chirurgicale. Toate îmbracă tabloul clinic de boală tromboembolică cronică. În patogenia acestui sindrom se pot întâlni una din următoarele situații: insuficientă sinteză a activatorilor plasminogenului; blocaj al eliberării activatorilor plasminogenului (boala membranei hialine a nou-născutului); *clearance* accelerat al activatorilor din circulație; deficiență de sinteză a plasminogenului; supraproducție de inhibitori antifibrinolitici; administrare de antifibrinolitice contraindicată.

Fibrinoliza și coagularea (78). În contextul reacțiilor organismului, fibrinoliza reprezintă mecanismul prin care organismul se debarasează de orice acumulare de fibrină, devenită nenecesară după împlinirea rolului pentru care a fost depusă. În ultimă instanță, această debarasare are ca scop menținerea căilor circulației în permanență deschise și eficiente. Sub acest raport funcția fibrinolizei este net opusă celei pe care o îndeplinește hemostaza.

Este greu de admis că, la vertebrate, mecanismul hemostatic atât de dezvoltat și complex a fost creat și perfecționat numai pentru a face față rarelor momente de pericol și că în viața de toate zilele, el nu ar acționa permanent. Tot mai mult și-a făcut loc părerea după care coagularea (timpul plasmatic al hemostazei) nu este un fenomen episodic, ci permanent, continuu și echilibrat, chiar dacă se desfășoară fără nici o exprimare clinică. Durata de viață foarte scurtă a factorilor coagulării confirmă părerea că elaborarea fibrinei și lichidarea ei se petrec în mod continuu; consumul fibrinogenului în cursul acestor procese se reflectă în durata sa de viață destul de scurtă (4 zile semiviață). Or, dacă menținerea fluidității sângelui în circumstanțe care impun totuși apariția de coagulări, este o necesitate majoră, atunci, în cadrul echilibrului homeostatic, fibrinoliza trebuie concepută ca mecanismul antagonist hemostazei.

Redusă la etapa sa finală, reacția în lanț a polimerizării fibrinogenului în fibrină, se află în ultimă instanță sub dependența efectelor contrarii ale celor două enzime proteolitice: trombina și plasmina. Exagerarea fenomenului, fie datorită hiperacțiunii primei enzime, fie hipoacțiunii celeilalte, produce apariția unui trombus sau unei plăci de fibrină (inițiatorii leziunii ateroscleroase). Inversul, interpretat prin prisma aceluiași mecanism de balanță, poate fi cauzat printr-o deficiență a primei enzime sau prin hiperfuncția celeilalte; efectul va fi apariția unui sindrom hemoragic.

În ambele sisteme (fig. XIV.28), factorul final este reprezentat de câte o enzimă proteolitică: trombina, respectiv plasmina. Prima desprinde din molecula de fibrinogen fibrinopeptide și dă naștere monomerilor de fibrină, care prin polimerizare formează fibrina. Cealaltă, desprinde din molecula de fibrină fibrinolizopeptide și dă naștere la produși de digestie solubili. Ambele enzime proteolitice sunt derivate fiecare dintr-un precursor inactiv prezent în plasmă: protrombina, respectiv plasminogenul

(fig. XIV.29). Activarea precursorului se poate realiza în ambele sisteme pe două căi: extrinsecă (tromboplastina tisulară, respectiv activatorul tisular) și intrinsecă (protrombinaza plasmatică, respectiv activatorul plasmatic). În ambele sisteme, calea extrinsecă folosește activator direct, cea intrinsecă activatori indirecți, de construcție mai complexă, care la rândul lor se formează din interacțiunea unor precursori (constelația factorilor protromboplastici, respectiv lizokinazele+proactivatorul). Asemănarea merge încă mai departe: ea cuprinde și respectivele grupe ale inhibitori-

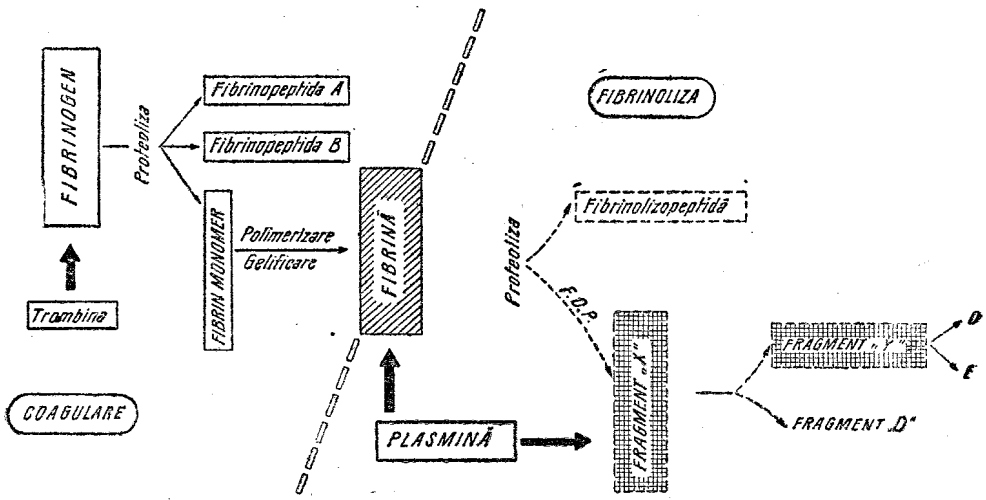


Fig. XIV.28. — Proteoliza trombinică și plasminică.

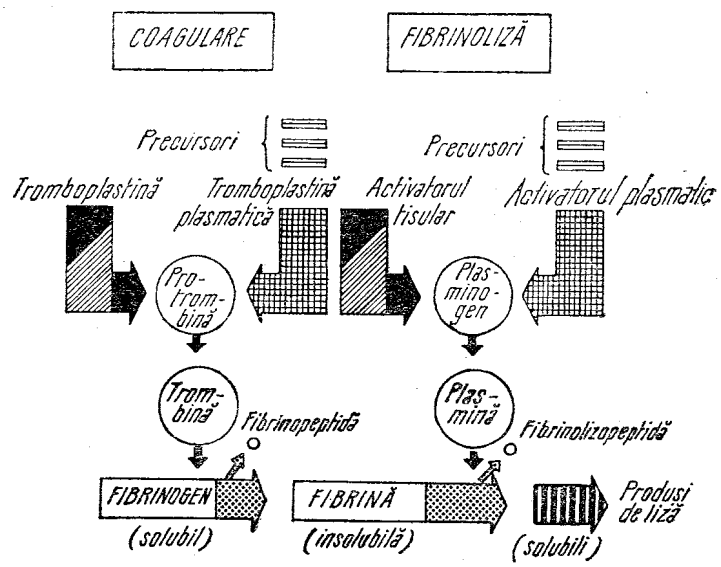


Fig. XIV.29. — Activarea în coagulare și fibrinoliză.

lor (fig. XIV.30). Așa cum în coagulare există antitromboplastină și antitrombină, tot așa în fibrinoliză se întâlnesc omoloagele acestora: antiactivatorul și antiplasmina.

În afara acestor pregnante asemănări, sistemul coagulării și cel fibrinolitic au și certe relații de interacțiune, sistematizate de von Kaulla după cum urmează:

a) *Influența factorilor coagulării asupra sistemului fibrinolitic.* Contactul plasmei cu suprafețe străine, care produce activarea factorului XII,

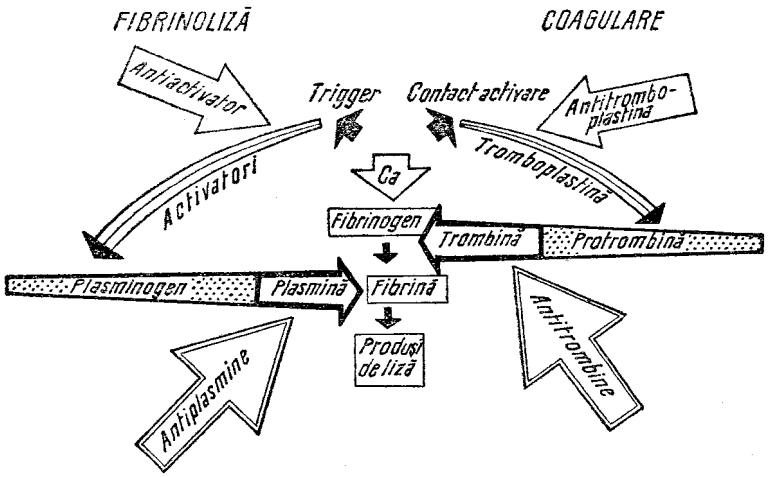


Fig. XIV.30. — Raportul fibrinoliză/coagulare (după J. L. Stafford).

activează subsecvent prin $FXII_{(a)}$ sistemul fibrinolitic. Dovada: această activare nu se produce la plasmele cu deficiență de factor XII, dar are loc la cele cu deficiențe ale tuturor celorlalți factori ai coagulării. Semnificația fiziopatologică a acestei interrelații se cunoaște în mod precis; lanțul greu al FXII activat acționează asupra proactivatorului plasmatic de o manieră asemănătoare unei lizokinaze.

Cercetări recente asupra FXIII au arătat că deficitul acestuia favorizează activitatea litică a plasminei asupra fibrinei; cheagurile formate în lipsa FXIII sunt lizate mult mai repede și mai ușor de plasmină, decât omoloagele lor normale. Faptul ține de diferența de structură între cele două tipuri de cheaguri.

b) *Influența sistemului fibrinolitic asupra factorilor coagulării.* Activarea moderată a sistemului fibrinolitic este întotdeauna însoțită de apariția unei imediate și foarte scurte hipercoagulabilități. Se pare că factorul incriminat este FV, a cărui activitate a fost găsită apreciabil crescută în toate aceste circumstanțe. Dacă însă activitatea fibrinolitică este mult crescută și de durată, efectul ei asupra coagulării este invers, ducând la instalarea unei marcate hipocoagulabilități. Mecanismul după care se realizează aceasta este complex; el afectează toate fazele coagulării:

— Generarea protrombinazei este frânată de diminuarea considerabilă a FVIII și FV (lizați de către plasmină).

— Transformarea fibrinogenului în fibrină este mult împiedicată de acțiunea de inhibare a polimerizării monomerilor de fibrină de către FDP și de nivelul extrem de scăzut al fibrinogenului însuși, ca urmare a acțiunii litice a plasminei asupra moleculei sale (fibrinogenoliză).

c) *Factor comun al coagulării și fibrinolizei,* fibrina joacă un rol important datorită adsorbției ce are loc la suprafața fibrelor ei. În coagulare, rețeaua de fibrină formată exercită o acțiune de frenare a procesului, adsorbind trombina pe fibrele ei. În fibrinoliză joacă rolul capital adsorbția exercitată de fibrinogen asupra proactivatorului și plasminogenului; numai astfel poate avea loc tromboliza, formă de homeostazie care favorizează liza fibrinei, protejând în același timp fibrinogenul și pe ceilalți factori ai coagulării.

Fibrinoliza și reparația tisulară (78). Apariția fibrinei nu reprezintă numai unul din timpii procesului hemostatic, prin care se oprește extravazarea sângelui după o injurie vasculară. Fibrina participă însă și în procesul de reparație tisulară, servind ca gazdă pentru fibroblaști și făcând astfel oficiu de matrice a țesutului conjunctiv de reparație. Cum zilnic mor celule din țesuturi (fie datorită senescenței, fie microinjuriilor tisulare), funcția fibrinei, de mulaj (eșafodaj) pentru reparațiile tisulare, capătă o importanță fiziologică la fel de mare cu cea din hemostază. Și cum acest gen de fibrină nu cuprinde elemente figurate, procesul lizei sale reprezintă transpunerea *in vivo* a celui întâlnit de Astrup *in vitro* la culturile de țesuturi.

Plecând de la aceste considerații, rezultă că formarea și lichidarea fibrinei sunt elementele de bază în procesul de reparație tisulară și că bilanțul lor reprezintă balanța fiziologică a acestui proces. Ubicuitatea tisulară a tromboplastinei și a activatorilor litici, coroborată cu prezența în lichidul interstițial și în limfă a fibrinogenului și a plasminogenului dau indicații neîndoielnice că formarea în țesuturi a depozitelor de fibrină și apoi lichidarea lor sunt fenomene ce se petrec cu regularitate în organismul normal. Depunerea de fibrină este necesară ca element de cofraj al reparației tisulare; rezoluția ei ulterioară este indispensabilă restabilirii condițiilor normale (fig. XIV.31).

Soarta unui cheag de fibrină din țesuturi este determinată de nivelul activității fibrinolitice caracteristice acelui țesut (vezi tabelul 14.III). Aceasta determină și cantitatea de țesut cicatriceal format. Așa se explică de ce în ficat are loc o formare extinsă de țesut conjunctiv de reparație (lipsa de activitate fibrinolitică nu permite o bună rezoluție a fibrinei depuse); în uter nu se întâlnește aproape niciodată țesut cicatriceal întins (activitatea fibrinolitică foarte ridicată duce la o rezoluție a fibrinei).

Fibrinoliza și sistemul kininelor vasoactive. Din grupul α_2-globulinelor plasmatice iau naștere în anumite condiții, printr-un fenomen de proteoliză, unele polipeptide biologic active, denumite kinine. Ele au următoarele proprietăți: dilată vasele și coboară TA; cresc permeabilitatea capilară; contractă unele fibre musculare netede (uter, jejun) și relaxează altele (colon); produc durere în regiunea respectivă (prin stimularea terminațiilor nervoase de la nivelul țesutului unde se produc).

Substratul din care iau naștere kininele este kininogenul, α_2-globulină plasmatică cu 2 variante: cu greutate moleculară mare (HMWK, 110 000 d

— F. Fitzgerald) şi cu greutate moleculară mică (LMWK, 60 000 d). Efectorul este o enzimă denumită kalikreină, cu acţiune proteolitică. Ea se găseşte în plasmă sub formă inactivă de kalikreinogen sau prekalikreină (F. Fletcher); activarea acesteia poate fi realizată de diferiţi factori: factorul Hageman activat [$FXII_{(a)}$ β], pH acid, epinefrina, tripsina, trombina şi plasmina. Ţesuturile lezate pun în libertate direct kalikreină activă; cele mai bogate în această enzimă sunt: pancreasul, rinichiul, glandele salivare, glandele sudoripare, glandele lacrimale, plexurile coroide. Şi în domeniul kininogenezei există două căi — intrinsecă şi extrinsecă, la fel ca şi în coagulare şi fibrinoliză (fig. XIV.32).

Recent a fost stabilită o interrelaţie destul de strânsă între sistemul kininelor vasoactive şi sistemele coagulării şi fibrinolizei. Legătura o fac

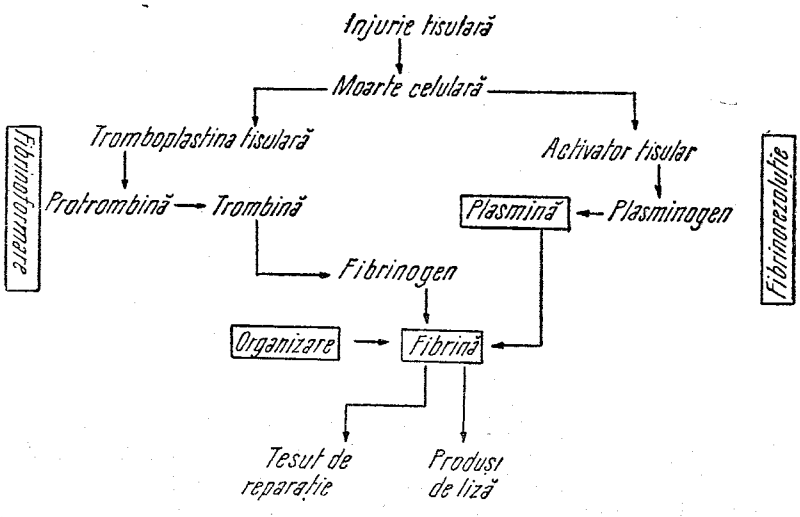


Fig. XIV.31. — Raportul fibrinoformare/fibrinoliză.

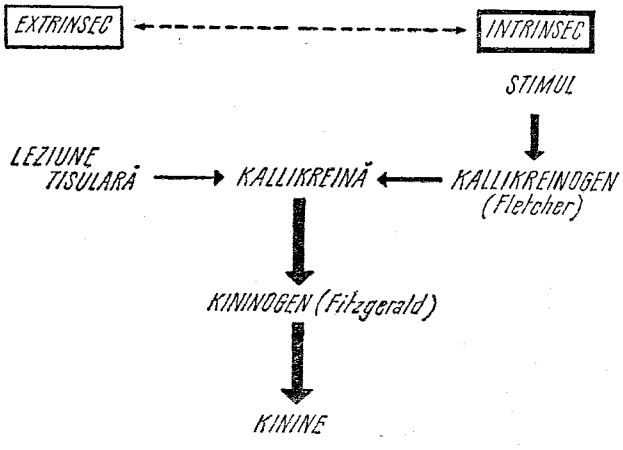


Fig. XIV.32. — Kininogeneză.

în primul rând cele două enzime proteolitice ale sistemelor de mai sus, trombina și plasmina, care se dovedesc capabile să activeze kalikreinogenul în kalikreină, inițiind astfel formarea de kinine. În al doilea rând, factorul Hagemann reprezintă o trăsătură comună de unire a celor trei sisteme, acționând în stadiul incipient al fiecăruia prin inițierea activării profactorilor premergători respectivi (fig. XIV.33). La rândul său, el își

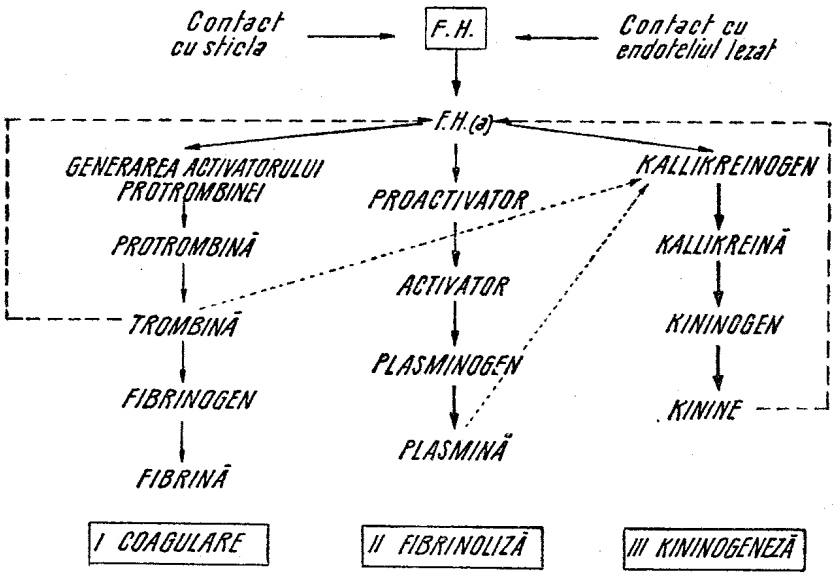


Fig. XIV.33. — Interferența dintre coagulare, fibrinoliză și kininogeneză.

realizează activarea datorită interacțiunilor cu cei 2 factori mai sus citați: F. Fitzgerald și F. Fletcher.

Legătura dintre cele 3 sisteme este destul de strânsă, ele formând un triplet implicat în multe stări patologice.

BIBLIOGRAFIE

1. BALDINI M. G., EBBE S.: Platelets production, function, transfusion, storage. Edit. Grune & Stratton, New York, 1974.
2. BARTON P. G., JACKSON C. M., HANAHAN D. J.: Nature 1967; 214: 923.
3. BECK E., DUCKERT F., ERNST M.: Thromb. Diath. Haemorrh. 1961; 6: 485.
4. BETTEX-GALLAND, LUSCHER E. F.: Biochim. biophys. Acta 1961; 49: 563.
5. BIEL H.: Arzneimitt. Forsch. 1971; 21: 1429.
6. BIGGS R.: Human blood coagulation. Haemostasis and Thrombosis. Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1976.
7. BLOMBACK B.: Brit. J. Haem. 1969; 17: 145.
8. BLOMBACK B., BLOMBACK M., NILSSON I. M.: Thromb. Diath. Haemorrh. 1957; 1: 76.
9. BOHN H.: Thromb. Diath. Haemorrh. 1970; 23: 455.
10. BOHN H., BECKER W., TROBISCH H.: Blut 1973; 26: 303.
11. BORN G. V. R., GROSS M. J.: J. Physiol. 1963; 168: 178.
12. BRANEMARK P. I.: Blut 1968; 16: 274.

13. BREDDIN H. K.: Prostaglandine und Plättchenfunktion. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1978.
14. BRINKHOUS K. M.: Thromb. Diath. Haemorrh. 1967; suppl. 26.
15. BRUHNH D., CHRISTOFERS E., POHL J., SCHOEL G.: Regulation der Fibroblastenproliferation durch Fibrinogen, Fibrin und Faktor XIII, Schattauer Verlag, Stuttgart, 1980.
16. CAEN J., SUITAN Y., MEYER D., ALLAIN J. P.: L'hémostase. Edit. Exp. Sc. Franç., Paris, 1970.
17. CASTALDI P., CAEN J.: J. Clin. Path. 1965; 18: 579.
18. COLMAN R. W., WONG P. Y.: Thromb. Haemost. 1977; 38: 751.
19. DAVID FERREIRA J. F.: Int. Rev. Cytol. 1974; 17: 99.
20. DAVIDSON J. P., SAMAMA M. M., DESNOYERS P. C.: Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis. Raven Press, New York, 1957.
21. DAVIE E. W., FUJIKAWA K.: Ann. Rev. Biochem. 1975; 44: 799.
22. DAWIE E. W., KIRBY E. P.: Ann. Rev. Biochem. 1975; 44: 899.
23. DEUTSCH E., LECHNER K.: Fibrinolyse, Thrombose, Hämostase, F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1980.
24. DOUGLAS A. S.: Clin. Haematol. 1973; 2: 1.
25. DUCKERT F.: Thromb. Diath. Haemorrh. 1975; suppl.
26. EASTHAM R. D.: Clinical Haematology. Edit. Wright, Bristol, 1984.
27. ENACHE FLORICA, POPPA C., ANDRONESCU S., CERNAT M.: St. Cercet. Med. Int. 1968; 9: 513.
28. ENACHE FLORICA: Contribuții la cinetica transformării fibrinogenului în fibrină, Teză de doctorat. Univ. București, 1972.
29. ENACHE FLORICA, POPPA C.: Stud. Cercet. Biochim. 1973; 16: 363.
30. ESNOUF M. P.: Brit. Med. Bull. 1977; 42: 88.
31. GAFFNEY P. C., BALKUV-ULUTIN S.: Fibrinolysis Current fundamental and clinical concepts. Acad. Press, Londra, 1978.
32. GRALNICK H. R., MARCHESI S. L., COLLER B. S.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 1975; 240: 378.
33. GREEN D.: Ann. clin. Lab. Sci. 1978; 8: 95.
34. HARDISTY R. M.: Brit. Med. Bull. 1977; 33: 207.
35. HEIMBURGER N., KARGES H. E.: Med. Lab. 1978; 5: 1.
36. HEMKER H. C., KAHN M. J. P.: Nature 1967; 215: 1201.
37. HILLER E., RIESS H.: Ther. Woche 1985; 35: 1533.
38. HOGENAUER E., LECHNER K., DEUTSCHE E.: Thromb. Diath. Haemorrh. 1968; 19: 304.
39. HOLMSEN H., DAY J., STORMORKEN H.: Scand. J. Haemat. 1969, suppl. 2: 1.
40. HOUGIE C. și colab.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1974; 147: 58.
41. HUGUES J.: Nouv. Rev. franç. Hématol. 1969; 9: 529.
42. HVATUM M., PRYDE H.: Thromb. Diath. Haemorrh. 1969; 21: 217.
43. ISRAELS S. D., PARASKEVA F., ISRAELS L. G.: J. Clin. Invest. 1973; 52: 2398.
44. KAULLA K. N. von: Chemistry of thrombolysis. Edit. Ch. Thomas, Springfield, 1963.
45. KNOCHE H., SCHMITT G.: Arzneimitt. Forsch. 1976; 26: 547.
46. KOWALSKI E., NIEWIAROWSKI S.: Biochemistry of blood, platelets. Academic Press, Londra, 1967.
47. KOWALSKI E.: Semin. Hemat. 1968; 1: 45.
48. LAKI K.: Fibrinogen. Edit. M. Dekker, New York, 1968.
49. LATALLO Z. S., FLETCHER A. P., ALKJAERSIG N., SHERRY S.: Amer. J. Physiol. 1962; 202: 681.
50. LORAND L., DOWNEY J., GOTOH T., JACOBSEN A., TOKURA S.: Biochem. biophys. Res. 1968; 31: 222.
51. MACFARLANE R. G.: The haemostatic mechanism in man and other animals. Acad. Press., Londra, 1970.
52. MAJOLINO J.: Haematologica 1979; 22: 18.
53. MASURE R.: Les inhibiteurs normaux et pathologiques de la coagulation sanguine. Masson & Cie, Paris, 1960.
54. MÉNACHÉ D.: Nouv. Rev. Fr. Hémat. 1965; 5: 309.

55. MOROI M., AOKI N.: J. Biol. Chem. 1976; 251: 5956.
56. MOSHER D. F.: J. Biol. Chem. 1975; 250: 6614.
57. MULLERTZ S.: Scand. J. Haemat. 1979; suppl. 18.
58. NORMAN P. S.: Fed. Proc. 1966; 25: 63.
59. OGSTON D., BENNETT B.: Haemostasis biochemistry, physiology and pathology. Edit. J. Wiley and Sons, Londra, 1977.
60. POLLER L.: Recent advances in blood coagulation. Edit. J. A. Churchill, Londra, 1979.
61. POPPA C., ENACHE FLORICA: Folia haemat. 1965; 84: 70.
62. POPPA C., ENACHE FLORICA: Med. Int. 1969; 21: 259.
63. POPPA C., ENACHE FLORICA: Nuclear Haemat. 1969; 5—6: 80.
64. RACHE H.: Klin. Wschr. 1975; 53: 1137.
65. RATNOFF O., SAITO H.: Proc. Nat. Acad. Sci. 1979; 44: 89.
66. ROSENBERG R. D.: New Engl. J. Med. 1975; 292: 146.
67. SAMUELSON B., PAULETTI R.: Advances in prostaglandin and thromboxane research. Raven Press, New York, 1976.
68. SHERRY S.: Series haematologica, vol. 7. Edit. Bjoilemar, Copenhaga, 1967.
69. SOKAL G.: Plaquettes sanguines et structure du caillot. Étude morphologique et thromboélastographique. Edit. Maloine, Paris, 1960.
70. SOULIER J. P., PROU-WARTELLE O.: Rev. Biol. 1959; 4: 932.
71. SPAET T. H.: Progress in Haemostasis and Thrombosis. Edit. Grune & Stratton, New York, 1978.
72. STEINBUCH M., BLATRIX C., JOSSO F.: Rev. franç. études clin. biol. 1968; 13: 179.
73. TODD A. S.: Brit. Med. Bull. 1964; 20: 210.
74. ULUTIN O. N.: The platelets. Kâgit ve Basim Işleri A.S., Istambul, 1976.
75. WARREN B. A.: Brit. Med. Bull. 1964; 20: 213.
76. WESSLER S., GITEL S. E.: Blood 1979; 53: 4.
77. WILLIAMS W. J., BEUTLER E., ERSLEV A. J., LICHTMAN M. A.: Hematology. McGraw-Hill Book Comp., New York, 1990.

XV

GRUPELE SANGUINE

MARIA DANIELESCU

Grupele sanguine reprezintă populații alcătuite din unele elemente figurate ale sângelui (eritrocite, trombocite, leucocite), care posedă anumiți antigeni care le caracterizează, identificați pentru prima oară pe eritrocite, dar prezenți și în foarte multe celule ale organismului. Aproape toate aplicațiile acestei descoperiri se referă la grupele sanguine eritrocitare.

Grupele sanguine se mențin constante, nu sunt în general modificate de factori de mediu sau de vârstă și se transmit ereditar după legile lui Mendel, fie dominant sau recesiv, fie combinat. În anumite stări patologice pot apărea însă modificări ale caracterelor grupelor sanguine, ca în leucemii acute sau în leucemia limfatică cronică.

Descoperirea grupelor sanguine a deschis nu numai noi căi de diagnostic și tratament în practica clinică ci a permis și aplicări importante în medicina legală, antropologie, etnologie, genetică.

GRUPELE SANGUINE ERITROCITARE

În practica clinică, cunoașterea grupelor sanguine eritrocitare are trei obiective principale:

a) evitarea unor accidente posttransfuzionale determinate de incompatibilitatea care ar putea exista între anticorpii primitorului de sânge și eritrocitele donatorului;

b) studiul bolii hemolitice a nou-născutului determinată de incompatibilitatea antigenică între eritrocitele mamei și eritrocitele fătului;

c) administrarea unui sânge care să nu conțină antigene în plus față de sângele primitorului, în vederea evitării pericolului de aloimunizare și, deci, pentru profilaxia accidentelor posttransfuzionale care ar putea surveni în cazul unor transfuzii ulterioare de sânge.

Semnificația clinică a anticorpilor de grup sanguin este dependentă de condițiile în care ei acționează și de specificitatea lor.

Majoritatea anticorpilor cu semnificație clinică sunt proteine de tip IgG și rareori sunt incriminați și anticorpi de tip IgM care, într-o incompatibilitate eritrocitară, pot duce la reacții hemolitice acute intravasculare.

Evitarea oricărui accident posttransfuzional se face prin efectuarea și determinarea, înaintea oricărei transfuzii de sânge, a grupelor de sânge 0AB, a factorului Rho (D), la donatori și primitor și a probelor de compatibilitate.

La bolnavii fără antecedente transfuzionale sau obstetricale probele de compatibilitate sunt simple — la temperatura camerei în mediu salin și la 37°, folosind enzime proteolitice cum este papaina cisteinată.

La bolnavii politransfuzați sau la femei cu antecedente obstetricale încărcate, așa-numiții „primitori periclitați", trebuie să se efectueze probe de compatibilitate transfuzionale mai complexe, și anume: la 18—22°C în mediu salin, la 37°C în mediu albuminos, la 37°C cu eritrocite tratate cu papaină cisteinată și testul Coombs indirect, față de seruri antiglobulinice mono- și polispecifice, avându-se în vedere natura imunochimică a anticorpilor și specificitatea lor serologică.

Până în prezent sunt cunoscute aproximativ 400 de antigene eritrocitare. La aceste 400 de antigene corespund tot atâția aloanticorpi. Ei apar la acele persoane cărora le lipsesc antigenele respective. Apariția aloanticorpilor este în funcție de imunogenitatea antigenelor, de cantitatea administrată și de capacitatea de răspuns a persoanei care a primit antigenul.

Dintre toate antigenele eritrocitare cele mai imunogene sunt A, B (din sistemul 0AB) și D (din sistemul Rh). După acestea urmează, c, E, C și Kell. De asemenea, antigenul Tj^a din sistemul P este puternic imunogen, dar frecvența apariției anticorpului anti-Tj^a este foarte mică, deoarece persoane Tj^a negative sunt 1 la 1 milion.

Antigenele M și N sunt foarte imunogene pentru unele animale (iepure), în timp ce, la om, ele provoacă rar un răspuns imun. La om anticorpii anti-M sau anti-N pot fi întâlniți destul de rar ca anticorpi de tip natural.

În serul unui bolnav neimunizat, pot apărea la 5—6 zile după o transfuzie incompatibilă, aloanticorpi față de antigenul absent pe eritrocitele sale, dar prezent pe eritrocitele donatorului, aloanticorpi care, în cazul unei noi transfuzii incompatibile, pot fi cauza unor accidente posttransfuzionale. Pentru acest motiv, testele de compatibilitate trebuie efectuate cu ser proaspăt, recoltat înaintea fiecărei transfuzii.

Grupele sanguine eritrocitare au o importanță deosebită și în practica medico-legală. Cu rare excepții, ele sunt caractere transmisibile. Un antigen eritrocitar va apărea pe eritrocitele copilului numai dacă el este prezent pe celulele unuia dintre părinții săi. Cu aportul unor seruri de bună calitate, determinarea fenotipică a grupelor sanguine a devenit o tehnică simplă, fără probleme de interpretare. Grație unor tehnici speciale, unele grupe sanguine — cum sunt sistemele 0AB, Secretor și Lewis — se pot determina de pe diverse obiecte, astfel că ele pot fi folosite în medicina legală.

Cunoașterea grupelor sanguine are, de asemenea, o deosebită importanță în antropologie, genetică, în studiul structurii de membrană,

ca și în medicina clinică. Majoritatea mecanismelor de transmitere ale unor boli își găsesc explicația în modul de transmitere a grupelor sanguine, relevând ca și la grupe, gene recesive, gene alele silențioase, modificări independente sau interacțiuni genetice.

De asemenea, trebuie amintit importanța determinării grupelor sanguine pentru donarea de sânge în cazuri de accidente colective sau de calamitate, în care activitatea organizatorică se bazează pe grupa sanguină 0AB înscrisă în actele de identitate ale populației.

Înainte de anul 1900, transfuzia de sânge era considerată o procedură terapeutică disperată, cu unele șanse de reușită și o mare probabilitate de accident mortal. După descoperirea grupelor sanguine de către Karl Landsteiner, transfuzia de sânge a devenit o practică terapeutică fundamentată științific și de mare eficacitate. Landsteiner a descris trei grupe sanguine, denumite cu literele A, B și 0 (zero), după cum pe eritrocitele respective se găsește aglutinogenul A, aglutinogenul B sau nu se găsesc nici unul dintre acestea. De Castello și Sturli au descris o a patra grupă de sânge, la care se găsesc ambele aglutinogene: A și B.

Ulterior, s-au descoperit treptat diferite alte antigene eritrocitare aparținând numeroasele sisteme eritrocitare cunoscute astăzi (13), și anume:

Sistemul	*Anul descoperirii*	*Sistemul*	*Anul descoperirii*
0AB	1900	Diego	1955
MNSs	1927	YT	1956
Pp	1927	Ii	1956
Rh	1940	Sutter	1958
Lutheran	1945	Gerbich	1960
Kell	1945	Auberger	1961
Lewis	1946	XG	1965
Duffy	1950	Dombrock	1965
Kidd	1951	Colton	1965
Vel	1952	Antigene rare	1946—1968
Wright	1953		

SISTEMUL 0AB

Deși au trecut 90 de ani de la descoperirea sistemul 0AB, el nu este încă în întregime cunoscut. Există petnru sistemul 0AB cel puțin 3 locusuri independente — 0AB, H, Se și, probabil, un al patrulea care determină exprimarea antigenelor. Primul descoperit rămâne totuși cel mai important. Importanța sistemului 0AB se datorește în primul rând existenței anticorpilor anti-A și anti-B de tip natural care pot cauza accidente posttransfuzionale extrem de grave, în cazul unor transfuzii incompatibile. Antigenele H, A și B se găsesc nu numai pe eritrocite, ci și în majoritatea țesuturilor corpului omenesc, ca și în mediul înconjurător, fapt care ridică importante probleme imunologice.

ca și în medicina clinică. Majoritatea mecanismelor de transmitere ale unor boli își găsesc explicația în modul de transmitere a grupelor sanguine, relevând ca și la grupe, gene recesive, gene alele silențioase, modificări independente sau interacțiuni genetice.

De asemenea, trebuie amintit importanța determinării grupelor sanguine pentru donarea de sânge în cazuri de accidente colective sau de calamitate, în care activitatea organizatorică se bazează pe grupa sanguină 0AB înscrisă în actele de identitate ale populației.

Înainte de anul 1900, transfuzia de sânge era considerată o procedură terapeutică disperată, cu unele șanse de reușită și o mare probabilitate de accident mortal. După descoperirea grupelor sanguine de către Karl Landsteiner, transfuzia de sânge a devenit o practică terapeutică fundamentată științific și de mare eficacitate. Landsteiner a descris trei grupe sanguine, denumite cu literele A, B și 0 (zero), după cum pe eritrocitele respective se găsește aglutinogenul A, aglutinogenul B sau nu se găsesc nici unul dintre acestea. De Castello și Sturli au descris o a patra grupă de sânge, la care se găsesc ambele aglutinogene: A și B.

Ulterior, s-au descoperit treptat diferite alte antigene eritrocitare aparținând numeroasele sisteme eritrocitare cunoscute astăzi (13), și anume:

Sistemul	*Anul descoperirii*	*Sistemul*	*Anul descoperirii*
0AB	1900	Diego	1955
MNSs	1927	YT	1956
Pp	1927	Ii	1956
Rh	1940	Sutter	1958
Lutheran	1945	Gerbich	1960
Kell	1945	Auberger	1961
Lewis	1946	XG	1965
Duffy	1950	Dombrock	1965
Kidd	1951	Colton	1965
Vel	1952	Antigene rare	1946—1968
Wright	1953		

SISTEMUL 0AB

Deși au trecut 90 de ani de la descoperirea sistemul 0AB, el nu este încă în întregime cunoscut. Există petnru sistemul 0AB cel puțin 3 locusuri independente — 0AB, H, Se și, probabil, un al patrulea care determină exprimarea antigenelor. Primul descoperit rămâne totuși cel mai important. Importanța sistemului 0AB se datorește în primul rând existenței anticorpilor anti-A și anti-B de tip natural care pot cauza accidente posttransfuzionale extrem de grave, în cazul unor transfuzii incompatibile. Antigenele H, A și B se găsesc nu numai pe eritrocite, ci și în majoritatea țesuturilor corpului omenesc, ca și în mediul înconjurător, fapt care ridică importante probleme imunologice.

Antigenele sistemului 0AB sunt de două feluri:

a) *Antigene fixate* pe celule, eritrocite, leucocite, trombocite, și celulele tuturor țesuturilor în afară de celula nervoasă, țesutul conjunctiv, hepatocit și celulele Malpighi. Aceste antigene, de natură glicolipidică, sunt numite aglutinogene, pentru că provoacă aglutinarea suportului corpuscular-eritrocitar, în cazul în care sunt puse în contact cu anticorpi omologi. Ele sunt alcoolosolubile.

b) *Antigene libere* în salivă, lacrimi, urină, sucul gastric etc., secretate de celulele mucoase, sub dependența următoarelor sisteme genetice: Sese, Lewis, Hh și 0AB. Ele se numesc substanțe de grup specifice, sunt de natură glicoproteică și sunt secretate într-o frecvență de 80% la persoanele care au gena Se (SeSe, Sese). Restul de 20% sunt întâlnite la subiecți nesecretori, care posedă gena recesivă se sub formă de homozigot (sese). Antigenele de grup H, A sau B se pun în evidență printr-o tehnică de hemaglutinoinhibare.

În cursul maturării eritrocitelor, sinteza antigenelor se efectuează în stadiul de proeritroblast. Antigenele H, A și B apar în săptămâna a 6-a de viață embrionară. Antigenicitatea lor crește treptat de-a lungul vieții fetale, așa încât la naștere se poate ușor determina grupa sanguină a nou-născutului prin metoda Beth-Vincent. În unele cazuri, puterea antigenică, în special a antigenului A, continuă să crească până la vârsta de adult. Numărul situsurilor antigenice de pe un eritrocit normal de adult, de grup A sau B, poate să ajungă în medie la sute de mii (800 000), în timp ce eritrocitul de nou-născut poartă numai 25—50% din numărul total de situsuri antigenice ale adultului.

Numărul situsurilor antigenice poate să scadă și în consecință se poate modifica și grupa sanguină, în special în cursul unor boli maligne ale țesutului hematopoietic.

• **Subgrupele antigenelor A și B.** În 1911 von Dungern diferențiază un antigen A puternic pe care-l denumește A tare sau A_1 și un antigen A slab, respectiv A_2. În cadrul grupei A sau AB au mai fost identificate antigene și mai slabe decât A_2, care au fost denumite A_{int}, A_3, A_m, A_x, A_{end}, A_{el} și A_{finn}.

Subgrupele antigenului B sunt mai puțin frecvente. Ele au fost denumite B_3, B_x, B_m, B_{el}. În urma unor cercetări pe familii, s-a dovedit că aceste subgrupe sunt determinate genetic, ele transmițându-se de la o generație la alta. Subgrupele au importanță atât teoretică cât și practică, deoarece un antigen A sau B slab poate să nu fie recunoscut de serurile test anti-A/anti-B și, în consecință, un donator de subgrup A_2 sau A_3 poate fi etichetat ca 0, iar unul A_2B sau A_3B, drept grup B. Aceste erori de grupe pot fi evitate numai prin executarea concomitentă și a metodei serice, metoda Simonin.

Antigenul H este comun, se găsește într-un procent de 99,99% și formează substanța fundamentală precursoare pentru antigenele A sau B. El este determinat de gena *H*. Alela acesteia — *h* — este foarte rară, iar forma homozigotă *hh* este cunoscută ca 0h sau fenotipul Bombay. În literatură sunt cunoscute aproximativ 30 de cazuri de fenotip Bombay. Eritrocitele acestor persoane nu posedă antigenele H, A sau B și, deci, nu reacționează cu serurile ce conțin anticorpi anti-A, anti-B sau anti-H. Serul persoanelor cu fenotipul Bombay conține totdeauna anticorpi anti-H,

anti-A și anti-B, așa încât, la nevoie, ele nu pot fi transfuzate cu sânge 0, A sau B, ci numai cu un sânge provenit de la o persoană cu fenotipul Bombay. Eritrocitele 0 în care nu s-a produs conversiunea antigenului H spre antigenul A sau antigenul B, au cel mai mult antigen H.

• **Anticorpii anti-A și anti-B,** după modul lor de apariție, sunt de două feluri: de tip natural și de tip imun.

Anticorpii de tip natural au o moleculă mare, de tip IgM sau IgA, care provoacă aglutinarea imediată a eritrocitelor ce conțin antigenul omolog A sau B. Ei se mai numesc și anticorpi de tip regular, deoarece apar fie în timpul vieții intrauterine, fie după naștere, la toate persoanele cărora le lipsește antigenul omolog. Anticorpii anti-A și anti-B de tip imun sunt anticorpi cu moleculă mică IgG și provoacă aglutinarea eritrocitelor într-un mediu macromolecular sau ca urmare a tratării eritrocitelor cu enzime (papaină cisteinată, bromelină sau ficină). Ei apar în urma unor procese de aloimunizare (sarcini incompatibile: mama 0 cu un făt A sau B, transfuzii incompatibile) sau heteroimunizare (diverse preparate farmaceutice de origine animală care conțin substanțe de grup A sau B).

Titrul anticorpilor anti-A și anti-B variază după vârstă, grup sanguin și starea fiziologică. Titruri mari se pot întâlni la persoane adulte de vârstă tânără și de grup 0. În general, titrul anti-A de la persoanele de grup 0 este mai mare decât anti-B și mai mare decât titrul anti-A de la persoanele de grup B. Când titrul anticorpilor anti-A și anti-B de tip imun de la persoanele de grup 0 este mai mare, aceste persoane, în calitate de donatori, devin „donatori universali periculoși" pentru bolnavii de grupuri A, B sau AB. Sângele din flacoanele respective poate fi transfuzat numai la bolnavii de grup 0 ori sub formă de masă eritrocitară sau eritrocite spălate și la bolnavii de grup A sau B.

În incompatibilitatea materno-fetală, mamă 0/făt A, ei traversează placenta și sunt responsabili de boala hemolitică a nou-născutului.

La copii sub 1 an, la bătrâni și la bolnavii cu boala Hodgkin, mielom multiplu, agammaglobulinemie și leucemie limfatică cronică, se semnalează adesea titruri mici de anticorpi sau chiar absența completă a acestora.

Caracterele anticorpilor de tip natural și imun sunt redate în tabelul 15.I.

Transmiterea ereditară a caracterelor de grup sanguin 0AB. În 1924, Bernstein descrie teoretic și demonstrează practic că antigenele de grup sanguin se transmit ereditar prin intermediul genelor, după legile lui Mendel. Pe fiecare cromosom din perechea a 9-a se găsește un locus care poate fi ocupat de una din cele trei alele A, B și 0. Gena 0 este considerată genă mută, deoarece antigenul respectiv nu poate fi pus în evidență. Genele A și B sunt considerate gene dominante față de 0 și condominante între ele. Antigenele A și B se pun în evidență cu ajutorul anticorpilor anti-A și anti-B.

Fiecare părinte transmite copilului său o singură genă prin intermediul cromosomilor.

Relația dintre fenotip și genotip în sistemul 0AB este redată în tabelul 15.II.

TABELUL 15.I

Caracterele anticorpilor anti-A şi anti-B

Caracterul	Anticorpi naturali (complet)	Anticorpi imuni (incompleţi)
Tipul de imunoglobulină	IgM, IgA	IgG
Temperatura de reacţie	+4—22°C	37°
Fixatori de complement	da	nu
Inactivare la 70°C sau neutralizare cu substanţe specifice	da	nu
Eritrocitele folosite (omoloage)	normale	tratate cu enzime

TABELUL 15.II

Relaţia dintre genotip şi fenotip în sistemul 0AB

Grupul	Fenotipul	Genotipul
0 ($\alpha\ \beta$)	0	00
A (β)	A	AA sau A0
B (α)	B	BB sau B0
$AB_{(o)}$	AB	AB

În cadrul grupelor A şi B merită subliniată prezenţa antigenelor A_1 şi A_2. Diferenţierea între A_1 şi A_2 s-a făcut iniţial cu serul anti-A şi anti-A_1. Dacă acest ser absorbit cu eritrocite A_2, în supernatant va rămâne anticorpul anti-A_1, care va reacţiona ulterior, numai cu eritrocitele clasificate A_1. Între eritrocitele A_1 şi A_2 sunt cunoscute diferenţe atât cantitative, cât şi calitative; cele cantitative constau în numărul de receptori pe membrană, A_1 posedând aproximativ 1 000 000, iar eritrocitele A_2, între 240 000 şi 300 000. Aranjamentul acestor receptori pe membrană este deseori diferit. În prezent există reactivi speciali care diferenţiază eritrocitele A_1 de A_2. Serul uman anti-A_1, ca şi lectina extrasă, din *Dolichos Biflorus*, aglutinează numai eritrocitele A_1 din grupa A şi AB (80%), în timp ce anti-H extras din seminţele *Ulex Europaeus* şi anti-H uman provenit de la persoanele A_1, A_1B şi fenotipul Bombay, aglutinează eritrocitele A_2 într-o proporţie de 20%. Ţinând seamă de faptul că antigenul A se prezintă sub 2 fenotipuri — A_1 şi A_2, se consideră că acestea sunt determinate, la rândul lor, de 2 gene A_1 şi A_2, care se transmit după acelaşi model mendelian. Pe locusul 0AB apar astfel 4 alele A_1, A_2, B şi 0. A_1 este

dominantă față de A_2 și A_2 față de 0. În tabelul 15.III se redă relația fenotip/genotip în sistemul 0AB, ținând seamă de subgrupele A_1 și A_2.

Celelalte subgrupe rar întâlnite: A_3, A_m, A_{el} sau B_3, B_m, B_{el} etc. pot fi puse în evidență numai prin determinarea grupelor 0AB, prin ambele metode (eritrocitară și serică); ele sunt alele la locusul 0AB și prezintă o deosebită importanță teoretică și practică.

Există patru reguli generale după care, cunoscând fenotipul mamei și al tatălui, se poate deduce fenotipul posibil al copilului. Aceste reguli se folosesc în expertizele medico-legale, în care paternitatea este disputată.

TABELUL 15.III

Fenotip și genotip posibil în cadrul sistemului 0AB pe subgrupe A_1 și A_2

Fenotip	Genotip posibil
A_1	A_1A_1, A_1A_2, A_10
A_2	A_2A_2, A_20
0	00
B	BB B0
A_1B	A_1B_1
A_2B	A_2B

1) Aglutinogenele A sau B nu pot fi prezente în sângele unui copil dacă ele nu se găsesc în sângele unuia sau ambilor părinți.

2) Un părinte de grup AB trebuie să transmită copilului fie aglutinogenul A, fie aglutinogenul B; el nu poate fi părintele unui copil de grup 0.

3) O persoană de grup 0 nu poate fi părintele unui copil de grup AB.

4) Antigenele A_1 și A_2 pot să apară la un copil numai dacă ele sunt prezente cel puțin la unul din părinți.

Cercetările fizico-chimice și imunogenetice din ultimele 3 decenii, pe substanțele hidrosolubile de grup sanguin, au dovedit că antigenele A și B nu sunt produsul direct al genelor. Genele codifică producerea unor enzime specifice, care adaugă la o substanță de bază (substanțe precursoare), glucidul specific grupei. Astfel, specificitatea H este determinată de gena *H*, care, prin intermediul enzimei alfa-2-fucozil transferaza, adaugă alfa-L-fucoză la substanța precursoare. Gena *H* este prima care acționează. Eritrocitele ce posedă numai antigenul H sunt de fapt eritrocitele de grup 0. Pe acest substrat de antigen H intervine gena A care codifică enzima N-acetilgalactozamin transferaza pentru a adăuga o N-acetilgalactozamină pentru grupul A; pentru specificita-

tea B, enzima D-galactozamin transferaza transportă pe același substrat de H, o moleculă de D-galactoză.

În anumite situații patologice, cercetarea enzimelor serice poate duce la elucidarea grupei sanguine. Astfel, la unii bolnavi de grup A, cu neoplasm de colon și suprainfecții cu E. coli O_{86}, printr-o dezacetilare bacteriană se pierde un radical N-acetil, eritrocitele devenind sensibile la anticorpi cu specificitatea anti-B. Antigenul respectiv este un antigen B „câștigat". Lipsa enzimei serice D-galactozamin transferaza demonstrează că, genetic, persoana respectivă nu posedă antigenul B.

Cercetarea enzimelor de grup sanguin aduce date importante și în unele boli maligne ale țesutului hematopoietic. În mod particular, unii bolnavi de leucemie, care pe parcursul bolii pierd antigenul A și devin A slab sau 0, au o cantitate normală de enzimă specifică grupului sanguin A. În această situație se pune problema dacă fenomenul constă într-o alterare de membrană eritrocitară sau este de funcționalitate genetică.

Frecvența grupelor sanguine 0AB în țara noastră a fost determinată ca urmare a decretului nr. 5 din 18.III.1971 pe un număr de 10 045 701 de probe de sânge, rezultând următoarele date:

grupa 0 (alfa-beta)	=32,68%
grupa A (beta)	=43,15%
grupa B (alfa)	=16,50%
grupa AB(o)	= 7,65%

Toate determinările s-au realizat atât prin metoda Beth-Vincent pentru cercetarea aglutinogenelor A și B, cât și prin proba Simonin, pentru cercetarea aglutininelor anti-A (alfa) și anti-B (beta).

Relații între grupul sanguin 0AB și anumite boli. Există numeroase asocieri între grupele sanguine din sistemul 0AB și diverse boli, asocieri descrise în literatura de specialitate. În cele ce urmează sunt amintite cele mai importante, în special acelea care interesează serologia grupului sanguin.

Variate stări de boală duc la alterarea antigenelor eritrocitare, în sensul slăbirii lor sau chiar al apariției unui nou antigen, așa-numit „antigen câștigat" sau „pseudoantigen". În unele cazuri de leucemie, în cursul bolii, antigenele A și B slăbesc, ele redevenind normale în perioadele de remisiune.

În boala Hodgkin s-au raportat mai multe cazuri cu o scădere a antigenelor HAB.

Nou-născutul de grup A sau B, cu antigenul moștenit de subgrup A_1, poate fi A_2, iar cel cu A_2 poate să apară ca A_3.

La subiecții de grup A, cu leziuni carcinomatoase pe intestin sau cu alte tulburări ce fac permeabil peretele intestinal, are loc o pătrundere a germenilor în circulație. Prin intermediul enzimelor bacteriene, în special produse de *Escherichia coli* 0_{86}, se produce o dezacetilare, fenomen în care N-acetil-galactozamina, glucidul specific grupei A, este convertit în D-galactozamină, glucidul specific grupei B. Astfel, unii bolnavi și chiar persoane sănătoase de grup A devin AB pentru o pe-

rioadă de timp limitată, deoarece fenomenul poate fi reversibil. Eritrocitele lor au un antigen B „câştigat" care reacţionează cu serul anti-B.

Foarte rar antigenul A „dobândit" a fost găsit la bolnavii cu stări septice, infecţii cu *Proteus vulgaris* sau *Proteus mirabilis.*

S-a observat, de asemenea, o absenţă sau slăbire a antigenelor HAB la bolnavii cu carcinom de stomac sau pancreas.

De o deosebită importanţă este boala hemolitică a nou-născutului în relaţie cu sistemul 0AB. Această boală apare la un nou-născut de grupa A sau B a cărui mamă posedă anticorpi anti-A, respectiv anti-B tip IgG, anticorpi care traversează placenta, pătrunzând în circulaţia nou-născutului şi producând sensibilizarea eritrocitelor sale.

Relaţia cea mai importantă este cea dintre sistemul 0AB şi transfuzia de sânge şi priveşte compatibilitatea ce trebuie să existe între primitorul şi donatorul de sânge. Datorită prezenţei anticorpilor anti-A şi anti-B în sistemul 0AB, o incompatibilitate transfuzională duce la reacţii hemolitice dintre cele mai severe. Anticorpii anti-A şi anti-B de tip natural sunt IgM, fixatori de complement şi duc la hemoliza intravasculară, în cazul unei transfuzii incompatibile.

O relaţie des întâlnită a fost discutată între sistemul 0AB şi ulcerul gastroduodenal. Este cunoscut că persoanele de grup 0 fac ulcer gastroduodenal într-o frecvenţă mai crescută cu 20% decât persoanele din celelalte grupe. Anemia feriprivă şi anemia megaloblastică de tip Biermer se întâlnesc cu precădere la persoanele de grup A.

SISTEMUL SECRETOR

În 1926, Yamakami descoperă că antigenele de grup sanguin HAB sunt secretate în salivă şi în celelalte lichide umorale: lacrimi, sucul gastric, transpiraţie, lichidul chistului hidatic etc. Numite şi substanţe de grup sanguin, ele sunt hidrosolubile şi din punct de vedere chimic sunt glicoproteine. Prezenţa lor în ser este determinată de un sistem genetic denumit secretor, cu 2 gene alele: *Se,* ca genă dominantă, şi *se* ca genă recesivă pentru acelaşi locus. Locusul sistemului secretor este aşezat foarte aproape de locusul sistemului Lutheran, pe perechea de cromosomi nr. 19. Subiecţii pot fi SeSe, Sese şi sese. Cei care posedă gena *Se* în simplă sau dublă cantitate sunt secretori de substanţă de grup sanguin HAB. Cei care sunt genotipic *sese* sunt nonsecretori.

În populaţia albă frecvenţa persoanelor secretoare este de 80% şi a celor nesecretoare de 20%. Secreţia în salivă a substanţelor HAB este în funcţie de grupul persoanei respective. Toţi secretorii, indiferent de grup, secretă substanţa H cantitativ variat în funcţie de grup; persoanele de grup 0 secretă cea mai mare cantitate de substanţă H, persoanele de grup A secretă substanţe H şi A. Dacă antigenul A este A_3 sau A_2 substanţa A este secretată în cantitate mică şi dacă este A tare (A_1) se secretă o cantitate mare de substanţă A şi mică de substanţă H.

Persoanele secretoare de grup B secretă, de asemenea, atât substanţa H şi B, iar cele de grup AB, secretă o cantitate mică de H şi cantităţi mai mari sau mai mici de substanţe A şi B în funcţie de subgrupa lor.

Importanța sistemului secretor. Cu ajutorul substanțelor de grup s-a putut descifra modul în care substanțele de grup ABH sunt sintetizate. În serul sanguin, așa cum s-a arătat la sistemul sanguin 0AB, au putut fi izolate și studiate enzimele specifice pentru substanțele H, A și B.

Dacă în unele leucemii antigenele eritrocitare A, B și H apar reduse, acest fenomen poate să fie un defect ce ține de eritrocit. În plasmă sau ser, substanțele de grup, ca și enzimele respective, rămân în cantitate normală, de unde reiese că genele sistemului secretor nu controlează transferazele H, A și B ale țesutului hematopoietic. În concluzie, cu ajutorul sistemului secretor (și numai în situația în care persoana este secretoare) se poate determina grupul sanguin în cazul când cel eritrocitar apare anormal.

Numeroase lucrări de statistică privind statusul secretor și ulcerul gastroduodenal afirmă că frecvența acestei boli crește cu 50% la persoanele nonsecretoare de substanțe HAB, față de cei secretori. Acest lucru s-ar explica prin rolul protector al mucopolizaharidelor asupra mucoasei intestinale.

Sistemul secretor este folosit și în cercetările de filiație. Genele acestui sistem se transmit după legile simple ale lui Mendel. Din doi părinți secretori poate să apară un copil nonsecretor, dar din doi părinți nonsecretori nu poate să apară un copil secretor.

SISTEMUL LEWIS

Este unic în felul său prin faptul că antigenele Lewis sunt singurele antigene sintetizate de către celulele tisulare, sunt secretate în plasmă și secreții și de aici adsorbite pe suprafața eritrocitelor. Ele nu fac, deci, parte integrantă din structura membranei eritrocitare.

Producerea lor este determinată nu numai de genele sistemului Lewis, ci și de interacțiunea genelor sistemelor secretor (Se se), Hh și 0AB.

Primul factor Lewis a sau Le(a) a fost descris în anul 1946 de către Mourant și al doilea factor Lewis b sau Le(b) de către Andersan în 1948. Genele sistemului Lewis sunt: gena *Le*, considerată gena dominantă și gena *le* recesivă. După teoria lui Grubb și Ceppellini, la o substanță precursoare dacă intervine gena dominantă *Le*, apoi gena *H* și genotipul sistemului secretor sese, subiectul apare Le(a+b—), secretor de substanță Lewis și cu prezență de Lewis(a) pe eritrocit și nesecretor de substanță H.

Prezența genelor *Le*, *H* și *Se* face ca substanța Le(a) să fie transformată în Le(b). Subiectul este în secreții Le(a), Le(b), secretor totdeauna de substanță H, iar pe eritrocit este Le(a—b+). Când în genotip un subiect este homozigot *lele*, el apare Le(a—b—), indiferent dacă este secretor sau nu de substanță H. Cu ajutorul anticorpilor anti-Le(a) și anti-Le(b) în populația rasei albe s-au găsit următoarele frecvențe eritrocitare: Le(a+b—) 24%, Le(a—b+) 70% și Le(a—b—) 6%.

Cercetarea sistemului Lewis la nou-născut a arătat că el nu este același ca la adult. Nou-născutul secretă în plasmă o cantitate foarte

mică de antigen Lewis care nu se fixează şi pe eritrocite, de aceea nou-născutul apare ca Le(a—b—). Eritrocitele de la copil care în viaţa de adult urmează să fie Le(a—b+), urmărite pe parcursul anilor, trec prin diverse stadii. Iniţial sunt Le(a—b—), apoi apar Le(a+b—), urmează faza Le(a+b+) şi, în fine, ele rămân Le(a—b+).

În ultimele două decenii au fost descoperiţi alţi anticorpi care aparţin sistemului Lewis. Ei dau aglutinare cu fenotipul Le(a—b—). Primul anticorp, denumit anti-Le(c), dă fenomen de aglutinare numai cu eritrocite ce posedă fenotipul Le(a—b—), deci genotipic sunt *lele* şi nesecretor de substanţă HAB. Antigenul Le(c) este similar, dar nu identic cu Le(a). Un alt anticorp, numit anti-Le(d) pune în evidenţă antigenul Le(d) la persoanele tot cu fenotip Le(a—b—), dar secretor de substanţă HAB. În lumina acestor fapte, în sistemul Lewis apar următoarele fenotipuri: Le(a+b—c—d—); Le(a—b+c—d—); Le(a—b—c+d—); Le(a—b—c—d+).

Anticorpii anti-Lewis. Anticorpii sistemului Lewis au următoarele specificităţi: anti-Le a, anti-Le b, anti-Le x, Anti-Le c şi anti-Le d. Aproape toţi anticorpii sunt de tip natural, cu structura chimică IgM şi cu rare excepţii IgG de tip imun.

Cel mai des întâlniţi sunt anticorpii cu specificitate anti-Le a, care apar în exclusivitate la persoanele Le(a—b—). Anticorpii anti-Le b sunt mai rar întâlniţi la acelaşi fenotip Le(a—b—) şi adesea întovărăşiţi de specificitatea anti-Le a. Rareori s-au găsit anticorpi cu specificitatea numai Le b la fenotipul Le(a+b—).

Anticorpii anti-Lex sunt o combinaţie a celor 2 specificităţi anti-Le a+anti-Le b şi apar destul de des la persoanele Le(a—b—).

Anticorpii cu specificităţile anti-Le c şi anti-Le d sunt rar întâlniţi şi fără semnificaţie clinică.

Dintre toţi anticorpii sistemului Lewis, cei mai importanţi sunt cei cu specificitatea anti-Le a şi anti-Le x.

Fiind imunoglobuline de tip IgM, anticorpii sistemului Lewis nu traversează placenta şi nu sunt implicaţi în boala hemolitică a nou-născutului. Ei joacă un rol important în transfuzia de sânge, deoarece sunt mari activatori de complement, comportându-se ca anticorpii din cadrul sistemului 0AB cu rol de hemoliză, producând, astfel, intravascular hemoliza eritrocitelor incompatibile. Anticorpii anti-Lewis de tip IgM implicaţi în accidentele transfuzionale au o scară de temperaturi şi de reactivitate largă, de la +4° la +37°C. *In vitro* ei sunt puşi în evidenţă în diverse medii (albumina bovină, ser fiziologic, ser uman, enzime) şi cu diverse tehnici (teste de aglutinare directă, centrifugare, hemoliză, test Coombs indirect). Anticorpii anti-Lewis de tip imun IgG apar foarte rar şi pot avea implicaţii în boala hemolitică a nou-născutului.

SISTEMUL RHESUS

Descris în anul 1940 de către Landsteiner şi Wiener, factorul Rh, denumit aşa prin analogie cu cel găsit la maimuţa *Macaccus rhesus*, a căpătat repede o importanţă deosebită prin faptul că a elucidat cauzele bolii hemolitice a nou-născutului şi a accidentelor posttranfuzionale în

cazul unei compatibilități perfecte în sistemul 0AB. Cercetările ulterioare au arătat că, de fapt, el formează un sistem cu mai mulți factori. Sistemul Rh și-a găsit repede aplicabilitate într-o serie de alte domenii, ca genetică, medicină legală și antropologie.

Genetica sistemului Rh. În ultimii 40 de ani, prin intermediul anticorpilor omologi, au fost descoperite mai mult de 30 de antigene ce aparțin sistemului Rh. Denumirea acestor antigene diferă după autorii care au descris conceptele genetice: Rosenfield (Rh), Fisher-Race (CDE), Wiener (Rh-hr). În tabelul 15.IV se redau cele mai importante antigene notate după autorii respectivi și frecvența lor în populația albă.

TABELUL 15.IV

Corespondența denumirilor antigenelor din sistemul Rh

Sistem Rh*	Sistem CDE**	Sistem Rh-hr***	Frecvența (%) în populația albă
Rh 1	D	Rho	84
Rh 2	C	rh′	70
Rh 3	E	rh″	30
Rh 4	c	hr′	80
Rh 5	e	hr″	98
Rh 6	ce(f)	hr	64
Rh 8	C^w	rh^{w1}	1
Rh 9	C^x	rh^x	extrem de rar
Rh 11	E^w	rh^{w2}	extrem de rar
Rh 12	G	rh^G	85
Rh 17	—	Hr o	—
Rh 22	CE	rh	—
Rh 39	C-*like*		

*Rosenfield; **Risher-Race; ***Wiener.

Genele sistemului Rh sunt localizate aproape de capătul brațului scurt al cromosomului 1. Ele sunt lincate cu genele $E1_1$, ce determină un anumit tip de eliptocitoză eritrocitară, cu genele enzimelor fosfoglucomutază (PGM), G-fosfogluconat dehidrogenază (G-PGD) și C-peptidază (Pep C).

Primul concept genetic descris de Wiener (pentru care folosește nomenclatura Rh-hr) presupune existența pe cromosom a unui singur locus foarte complex la care concură multiple gene alele. Fiecare genă codifică formarea pe suprafața eritrocitului a unui antigen specific. Antigenul sau aglutinogenul eritrocitar poate conține 2 sau 3 factori, care se pun în

evidență numai prin intermediul anticorpilor omologi lor anti-Rho, anti-rh', anti-rh'' etc.

Fisher și colab. adoptă pentru sistemul Rh nomenclatura cu literele D, C, E, d, c, e. Cu ajutorul a 4 seruri, și anume: anti-C, anti-c, anti-E și anti-e, se descoperă că antigenul C este antitetic cu c, iar antigenul E cu e. Aceasta înseamnă că, dacă cu unul din seruri, de exemplu cu anti-C, apare o reacție negativă, cu celălalt ser, anti-c, totdeauna apare o reacție pozitivă. Absența unui factor implică prezența celuilalt. Același lucru se poate spune și despre antigenele Ee. Eritrocitele pot fi EE, Ee sau ee. Această demonstrație a făcut pe autorii citați mai sus să presupună că pe cromosomul respectiv există 3 locusuri care determină prezența a 3 antigene eritrocitare: primul locus este ocupat de genele *D* sau *d*, la mijloc se află locusul afectat genelor *C* sau *c*, iar al treilea locus este pentru alele *E/e*. Această ordine genetică poate explica natura unor gene complexe, cum este *CE* sau *ce*, apărute ca urmare a fenomenului de *crossing-over*. În acest sens apar, în ordinea frecvenței, următoarele combinații cromosomiale, denumite haplotipuri; pentru ușurința exprimării se schimbă poziția literelor D, $\bar{d}$ cu C, $\bar{c}$: Cde, cde, cDE, cDe. Genotipul în sistem Rh, luat în considerație pentru cele 3 perechi de gene alele, poate fi homozigot (CDe/CDe) sau heterozigot (CDe/cdE).

Ulterior, pentru cele 3 locusuri, au mai fost descoperite și alte alele. Astfel, la locusul Dd au fost descrise alelele D^W, D^{cor}, Targett; la locusul Cc, alelele C^W, C^x, *c-like*, *C-like* etc. și E^W, e^S la locusul Ee. Aceste noi alele au fost stabilite ca rezultat al unor cercetări familiale sau, mai direct, prin descoperirea anticorpilor îndreptați față de inițiatorii lor. Până ce se vor descoperi anticorpii omologi lor, multe alele sunt considerate gene amorfe, așa cum este considerată, încă, gena *d*. Astfel, deoarece nu au fost descoperiți anticorpii anti-d, anticorpi care ar putea pune în evidență antigenul d, produs prezumtiv al genei *d*, unii autori ca, de exemplu, Wiener, consideră că această genă nu există, în timp ce alți autori, cum este Fisher, afirmă că gena există, dar că ea dă naștere unui antigen lipsit de antigenitate.

Lipsa anticorpilor anti-d creează dificultăți în stabilirea genotipului unei persoane Rho(D) pozitiv, deoarece nu se poate preciza dacă el este homozigot D/D sau este heterozigot D/d. Lucrul acesta se poate deduce cunoscând procentele haplotipurilor Rh și făcând determinări familiale.

Fenotipul, genotipul și transmiterea ereditară în cadrul sistemului Rh. După Wiener, fenotipul se identifică prin rezultatul unei reacții antigen-anticorp, respectiv între eritrocitele unui subiect și antiseruri cunoscute. În cadrul sistemului Rh, în mod curent, se lucrează cu 5 seruri cunoscute. În tabelul 15.V se redau câteva exemple de determinări fenotipice.

Din tabel reiese că numai la proba de sânge nr. 2, fenotipul este egal cu genotipul; la restul de cazuri, genotipul se poate prezenta sub diverse forme și poate fi precizat numai printr-un studiu de familie.

În tabelul 15.VI se redau câteva exemple de transmitere ereditară și de stabilire a genotipului Rh.

TABELUL 15.V

Determinarea fenotipică Rh și genotipul posibil la 5 probe de sânge

Seruri anti	Probe de sânge nr.				
	1	2	3	4	5
C	+	—	+	—	—
D	+	—	+	+	+
E	+	—	—	+	—
c	+	+	+	+	+
e	+	+	+	—	+
fenotip	CDE ce	ce	CDce	DEc	Dce
genotip probabil	CDe/cDE sau CDe/cdE sau Cde/cDE	cde/cde	CDe/cde sau CDe/cDe sau Cde/cDe	cDE/cDE sau cdE/cDE	cDe/cde sau cDe/cDe

Legendă:

+ = reacție pozitivă
— = reacție negativă

Din exemplele familiale 1 și 2, care sunt reprezentate și în fig. XV.1, se demonstrează care din fenotipul copiilor poate deduce genotipul părinților.

La familia nr. 2, dacă nu ar fi existat copilul 2, cu fenotipul Ece, din care s-a putut preciza genotipul cde/cdE, eram tentați, după frecvența în populație a haplotipului cDE, în comparație cu cdE, să afirmăm că genotipul mamei ar fi CDe/cDE, când, de fapt, el este heterozigot pentru factorul D (CDe/cdE).

Genele sistemului Rh se transmit de la o generație la alta după legile lui Mendel. Toți factorii pentru care există anti-seruri (CcDEe) sunt considerați factori codominanți și numai factorul d, față de factorul D este considerat un factor recesiv.

În exemplele familiilor nr. 1 și 2 (tabelul 15.VI și fig. XV.1) se vede, de asemenea, copiii primesc de la fiecare din părinți câte un haplotip din genomul acestora.

În fig. XV.1 este reprezentată și familia nr. 3 din tabelul 15.VI și se redă o excludere de paternitate pe factorul E. Acest factor, prezent la copil, nu a fost găsit la nici unul din părinți.

Exluderea de paternitate pentru ceilalți factori se judecă în același mod. Trebuie subliniat, în mod deosebit, problema factorilor D și d. Din

TABELUL 15.VI

Precizarea fenotipului Rh în cazul a 3 familii

Nr. fam.	Gradul de rudenie	Seruri anti-					Fenotip	Genotip
		C	D	E	c	e		
1	mamă	—	—	—	+	+	ce	cde/cde
	tată	+	+	—	+	+	CDce	CDe/cde sau Cde/cDe
	copil	—	—	—	+	+	ce	cde/cde
2	mamă	+	+	+	+	+	CDEce	CDe/cDE, Cde/cDE, CDe/cdE
	tată	+	+	—	+	+	CDce	CDe/cde, Cde/cDe
	copil 1	+	+	+	+	+	CDEce	CDe/cDE, Cde/cDE, CDe/cdE
	copil 2	—	—	+	+	+	Ece	cde/cdE
3	mamă	+	+	—	—	+	CDe	CDe/CDe sau CDe/Cde
	tată	+	+		+	+	CDce	CDe/cDe sau CDe/cde
	copil	+	+	+	+	+	CDEce	CDe/cDE

doi părinți Rho(D) pozitivi este posibil să apară un copil Rho(d) negativ, atunci când ambii părinți sunt heterozigoți Dd, dar din doi părinți Rho(D) negativi nu este posibil să apară un copil Rho(D) pozitiv.

Nomenclatura lui Rosenfield cuprinde terminologia numerică a tuturor antigenelor din sistemul Rh, începând cu Rh 1 până la Rh 47. Cei 47 de factori care sunt alele la cele 3 locusuri și corespund unor antiseruri specifice, au fost numerotați în ordinea descoperirii sau a admiterii factorului în cadrul sistemului Rh.

Deleția parțială și totală în sistemul Rh. În 1951, Race și Sanger au descoperit pentru prima dată unele eritrocite care nu dădeau aglutinare cu serurile specifice anti-C, anti-c, anti-E și anti-e. Aceasta presupune lipsa alelelor *Cc* și *Ee* pentru locusul respectiv. Eritrocitele aveau în schimb o expresie crescută a factorului D. Acest fenotip rar se consideră a fi rezultatul unei gene rare, în formă homozigotă, —D—/—D—. Creș-

terea expresivității factorului D se explică prin lipsa de competiție față de celelalte gene din sistemul Rh. Fenomenul respectiv a fost observat și pentru formele heterozigote —D—/CDe sau —D—/cDE. Deleția parțială poate apărea și numai pentru locusul *E/e*. Majoritatea persoanelor cu deleție Rh au anticorpii produși pe cale naturală sau imună în special, în titru mare, cu specificitate față de antigenele absente din sistemul Rh;

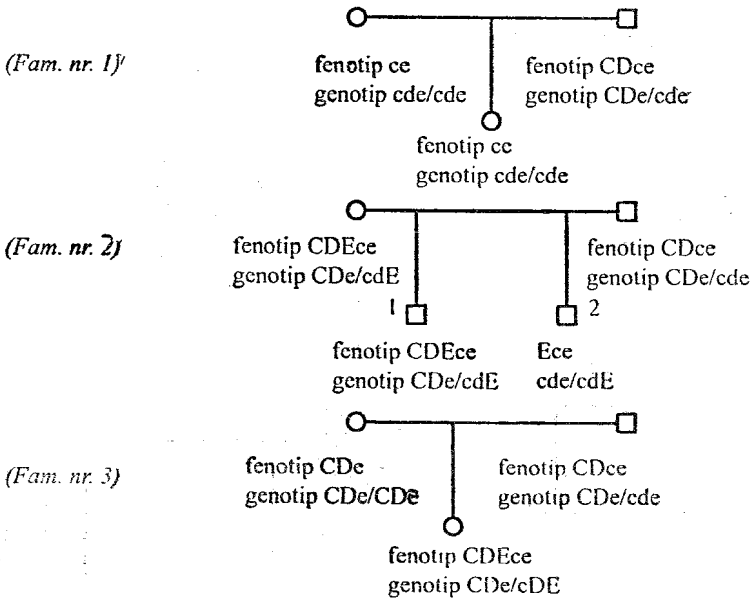


Fig. XV.1. — Corelația dintre fenotipurile Rh în cadrul a trei familii.

de exemplu, Rh 17 (Hro) este un antigen cu frecvență mare și absent la persoanele —D—/—D—. În unele cazuri, se întâlnesc și anticorpi cu specificitate mai comună, cunoscuți ca anti-c și anti-e.

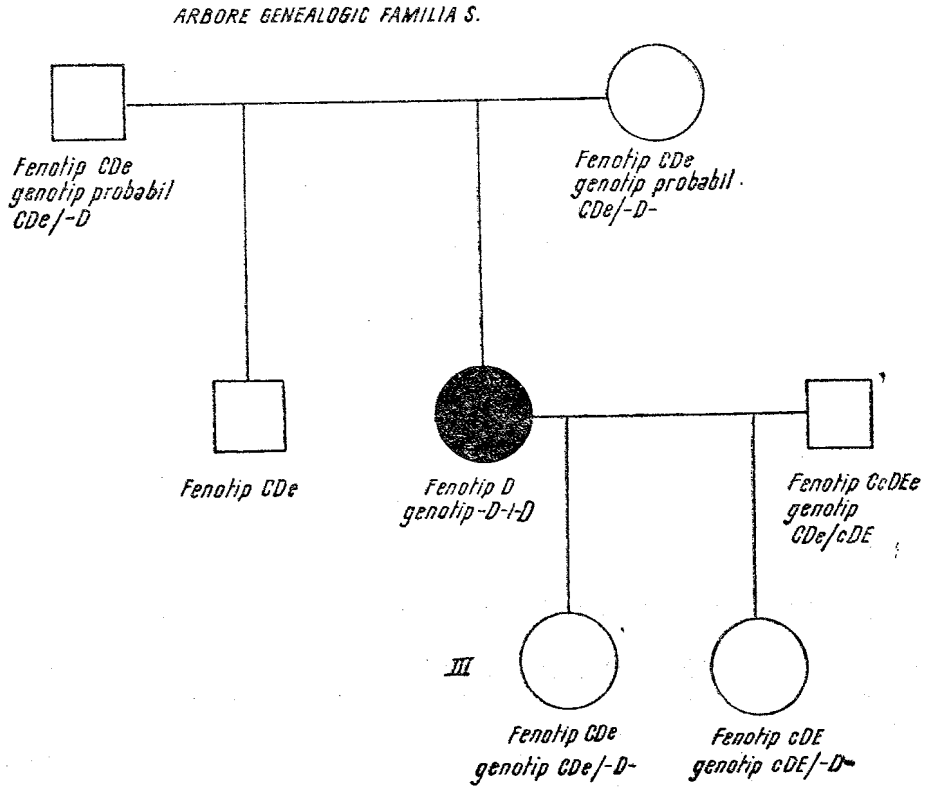
În 1961, Vos și colab. descriu cazul unei femei din Australia, care nu avea nici un antigen din sistemul Rh. Această formă rară de sânge a fost numită deleție totală sau Rh nul (sindrom Rh nul). În formă homozigotă, se scrie sub formula următoare — — — / — — —. Apariția acestei forme rare de Rh se explică genetic în două moduri: prin absența antigenelor Rh, cauzată, în forma sa homozigotă, de o genă supresoare nelincată; sau prin Rh nul care apare la acele persoane care sunt homozigote pentru o genă amorfă la locusul Rh, genă care a fost numită $\overline{\overline{r}}$.

Numărul cazurilor de deleție parțială și totală în sistemul Rh descoperite azi este mare. Ele sunt întâlnite la toate rasele, dar mai des la populația de culoare neagră.

În țara noastră a fost găsită o femeie, al cărei genotip din sistemul Rh era homozigot, în deleție parțială: —D—/—D—. Studiul de familie pe 3 generații a demonstrat că ea provenea din 2 părinți, ambii în deleție pe un singur haplotip (mamă = CDe/—D—; tată = CDe/—D—). Factorul Rho(D) era de o expresivitate deosebită. El dădea reacție pozitivă în

câteva secunde, cu un ser anti-Rho(D), de tip IgG. Femeia era imunizată prin incompatibilitate de sarcină față de toți factorii din sistemul Rh existenți la feți și moșteniți de la tată (CDe/CDe) (10).

Ca și în cazurile de deleție parțială, persoanele Rh nul se imunizează foarte puternic față de toate antigenele Rh, în mod deosebit față de Rh 29 sau Rh total.



Femeile gravide sau bolnavii cu deleție parțială sau totală reprezintă o problemă din punct de vedere serologic, deoarece, în caz de necesitate transfuzională, sau de tratament al nou-născutului prin exsanguinotransfuzie, trebuie utilizat numai un sânge asemănător. Eritrocitele cu Rh nul au formă de stomatocite, iar din punct de vedere funcțional, se comportă anormal, având o durată de viață mai scurtă, evidențiind o anemie hemolitică.

În toate cazurile studiate, s-a găsit un număr crescut de reticulocite, ca o compensare a distrugerii eritrocitare. Subiecții respectivi sunt adaptați la această situație și duc o viață normală.

Expresivitatea antigenică a sistemului Rh. Antigenele sistemului Rh sunt bine dezvoltate la naștere, ele apărând din săptămâna a 6-a de viață intrauterină. Așa se explică de ce printr-o incompatibilitate ma-

terno-fetală [mamă Rho(D) negativ cu făt Rho(D) pozitiv], la unele gravide se pot întâlni anticorpi anti-Rho(D) chiar din luna a 3-a de sarcină.

Expresivitatea antigenelor Rh este diferită. Factorul D este cel mai puternic exprimat și cel mai imunogen. După factorul D, ca imunogenitate urmează c, E, C și e.

Expresivitatea antigenului D a fost mult studiată. În 1946, Stratton și colab. au arătat că factorul D, de pe anumite eșantioane de eritrocite, se comportă foarte diferit. Ele nu aglutinează sau aglutinează foarte slab cu seruri anti-D, în comparație cu alte eritrocite care se comportă normal. Acest factor a fost numit D^u. El poate fi determinat numai cu anumite seruri foarte puternice, cu adaos de enzime proteolitice sau cu seruri anti-D, de tip IgG, folosind testul antiglobulinic indirect.

Expresivitatea factorului D poate fi diminuată mult, ca rezultat al interacțiunii genetice sau ca efect de poziție genică (efectul unei gene de pe celălalt cromosom). De exemplu, factorul D din genotipul CDe/cde are o expresie redusă, dar și mai redusă apare în genotipul CDe/Cde. De aici reiese că factorul D apare ca un D^u în combinație cu C, în timp ce același factor în combinație haplotipică cu E (cDE) sau genotip cDE/cDE devine mai puternic.

După Wiener și Unger, factorul Rho(D) este un mozaic format din mai multe componente. Patru determinante individuale au fost recunoscute și denumite Rh^A, Rh^B, Rh^C și Rh^D. Lipsa uneia sau mai multor componente poate determina ca persoana respectivă să formeze anticorpi anti-Rh(D) față de componenta sau componentele absente. Acești anticorpi nu trebuie considerați autoanticorpi. În astfel de cazuri testul Coombs direct este negativ.

Primitorul de sânge cu factor D^u trebuie considerat ca Rh negativ și transfuzat cu sânge Rho(D) negativ, iar donatorul de sânge trebuie considerat Rho(D) pozitiv. O gravidă cu factorul D^u cu soț Rho(D) pozitiv trebuie să fie controlată periodic pentru a detecta formarea de anticorpi anti-D.

Determinarea celorlalți factori (C, c, E, e) nu se face în practica de rutină, deoarece serurile sunt extrem de scumpe. În practica transfuzională, ei se determină cu scopul de a se confirma specificitatea unui aloanticorp.

Anticorpii din sistemul Rh sunt de tip imun și numai în cazuri excepționale pot apărea și anticorpi de tip natural. Anticorpi anti-Rh de tip natural, cu multiple specificități, au fost întâlniți numai la unele persoane cu deleție parțială sau totală în sistemul Rh. La persoanele normale, numai în mod excepțional au fost descriși anticorpi de tip natural cu specificitatea anti-C și anti-E. În rest, toți anticorpii din sistemul Rh sunt, de fapt, aloimuni sau autoimuni. Ei sunt Ig de tip IgG, subclasa G_1 și G_3 (așa-numiții anticorpi de tip incomplet). Anticorpii de tip IgM apar în acest sistem numai într-o fază trecătoare și nu pot fi puși în evidență.

Frecvența cea mai mare o au anticorpii cu specificitate anti-D, deoarece factorul D este cel mai imunogen. Ei apar în urma unor sarcini incompatibile sau transfuzii incompatibile (gravidă sau, respectiv, bolnav cde/cde, cu soț sau, respectiv, flacon de sânge D/D, D/d sau D^u/d). În incompatibilitate de sarcină, ei apar într-o frecvență de 5—7%, iar

în incompatibilitatea transfuzională, pot fi întâlniți la 50—80% dacă numărul de transfuzii incompatibile este mare. Titrul anticorpilor anti-Rho(D) variază și el, fiind în funcție de răspunsul imun al persoanei respective, de numărul de stimuli antigenici și de cantitatea de sânge administrată. În raport cu numărul de stimuli și cantitatea de sânge, la unele persoane hiperimunizate se întâlnesc și anticorpi de tip IgM. Serurile cu anticorpi de tip IgM sunt extrem de rare și foarte importante, putând fi folosite ca reactivi pentru determinarea factorului Rho(D) slab, (D^u).

De cele mai multe ori, anticorpii anti-D sunt asociați cu anticorpii anti-C și/sau anti-E.

Toți ceilalți anticorpi (anti-C, -e și -E) apar în același mod, prin incompatibilitate de sarcină sau transfuzională. De exemplu, o persoană cu genotipul CDe/CDe, transfuzată cu sânge cDE/cDE, cde/cde, poate forma anticorpi anti-c+E sau numai anti-c.

Anticorpii cu specificitate anti-e se întâlnesc foarte rar ca aloanticorpi; cel mai des apar ca autoanticorpi în cadrul anemiilor autoimune la cald. Sunt două motive care explică de ce anticorpii cu specificitate anti-e apar așa de rar ca aloanticorpi: antigenul e are o frecvență de 98% și este slab antigenic.

Anticorpii din sistemul Rh, odată apăruți, persistă toată viața. De-a lungul anilor ei pot să scadă în valoare cantitativă, dacă nu intervin alți stimuli antigenici. Prezența lor reprezintă totdeauna un pericol, dacă se execută o transfuzie incompatibilă. Ei se pun în evidență prin tehnici executate în mediu albuminos, mediu enzimatic și testul antiglobulinic indirect, față de eritrocite ce posedă antigenul omolog anticorpului.

Semnificația clinică a sistemului Rh. Sistemul Rh are o mare importanță practică. Astfel:

a) Incompatibilitatea de sarcină, în primul rând prin intermediul factorilor d/D și apoi C/c și e/E, duce în anumite procente, la diverse grade de boală hemolitică a nou-născutului. Descoperirea faptului că anticorpii anti-D pot fi folosiți ca gammaglobulină injectabilă, la femeile cu sarcini incompatibile și neimunizate, a redus mult procentul aloimunizării.

b) O transfuzie executată cu sânge lipsit de compatibilitate corectă pentru factorul Rho(D) poate duce la formarea de anticorpi anti-Rho(D). O nouă transfuzie incompatibilă, executată la un interval de cel puțin 7—10 zile după prima transfuzie, poate determina un accident posttransfuzional. Forma accidentului posttransfuzional este în funcție de titrul de anticorpi la primitor, de capacitatea acestora de a fi sau nu fixatori de complement și de cantitatea de sânge administrat. În rare cazuri se întâlnesc anticorpi anti-Rh fixatori de complement. Evitarea oricărui accident posttransfuzional este realizabilă prin executarea probelor de compatibilitate.

c) Sistemul Rh este utilizat în cercetările de filiație cu aceeași valoare ca și sistemul 0AB.

d) Descoperirea și aplicarea genotipului Rh cu deleție parțială și totală (Rh nul)) în studiul anticorpilor din anemiile hemolitice de tip la cald a demonstrat că acești anticorpi au specificitatea îndreptată față de antigenele Rh.

e) Utilizarea sistemului Rh în cercetările antropologice a arătat o mare variabilitate în frecvența antigenelor lui, în funcție de rasă și de mișcarea populației.

SISTEMUL MNS_sU

În 1927, după sistemul 0AB, Landsteiner și Levine descoperă al doilea sistem eritrocitar, MN. Ei imunizează iepuri cu eritrocite umane și constată că anticorpii serurilor acestor iepuri recunosc alte 2 antigene, pe care le denumesc M și N. Genele respective se dovedesc a fi codominante una față de cealaltă. După descoperirea serului antiglobulinic, în 1947, Walsh și Montgomery descriu un ser cu un anticorp pe care îl denumesc anti-S și pun în evidență antigenul S. Deși gena *S* nu s-a dovedit a fi alela genelor M și N, ea este strâns linkată cu acestea. În 1951, presupusa alelă a genei *S* a fost descoperită și a fost numită s. În felul acesta a fost definit sistemul MNSs, genele *MN* pentru un locus și genele *Ss* pentru al doilea locus, strâns legat cu primul. Astfel, apar 4 combinații cromosomale: *MS, Ms, NS* și *Ns.*

În 1953, Wiener descrie un anticorp cu frecvență foarte mare față de un antigen denumit U. Greenwalt și colab. găsesc că antigenul omolog U are o frecvență de 100% în populația albă, iar atunci când lipsește, lipsesc și antigenele S și s.

Ulterior, sistemul MNSsU s-a îmbogățit cu o serie de alte alele satelite, numite Tm, Sj Hunter, Stones, Ri^a, Vr etc., care au o frecvență foarte mică. Frecvența antigenelor MNSsU este redată în tabelul 15.VII.

TABELUL 15.VII

Frecvența antigenelor MNSsU, în populația albă

M=80%
N=74%
S=53%
s=94%
U=99,9%

Ca structură chimică, antigenele respective sunt glicoproteine, reprezentând o porțiune mare din membrana eritrocitară. Cunoscute sub numele de glicoforine, ele sunt formate din 2 părți: o parte proteică, componentă a membranei eritrocitare; și a doua parte formată din o serie de carbohidrați, atașați de partea proteică și situată în afara membranei.

Antigenele MN mai sunt numite și sialoglicoproteine, fiind bogate în acid sialic, în timp ce lanțul polipeptidic este bogat în serină și treonină. Ele sunt glicoforine de tip A, bine cunoscute ca secvență de aminoacizi și carbohidrați. Antigenele Ss, numite glicoforine de tip B, sunt și ele bogate în acid sialic, dar nu au încă o structură bine precizată.

Antigenele MNSs sunt bine dezvoltate la naștere. Anticorpii anti-M, anti-S și anti-s, de tip IgG, care au fost găsiți în serul mamelor, au fost incriminați în boala hemolitică a nou-născutului.

Recent, s-a dovedit că antigenul M se găsește și pe limfocite, iar antigenul U pe neutrofile. Până în prezent antigenele Ss au fost demonstrate numai pe eritrocite.

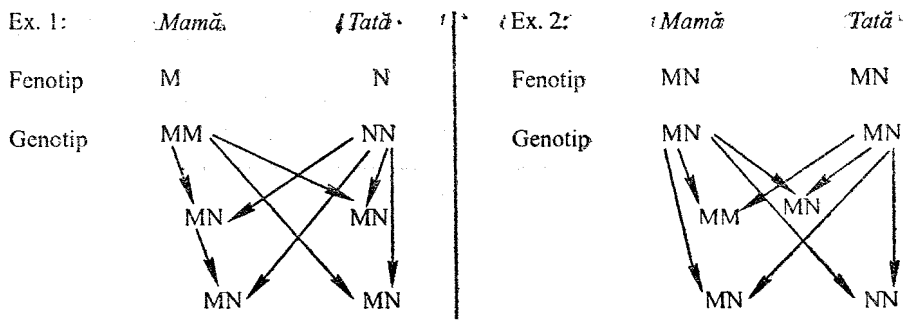
În majoritatea cazurilor, anticorpii anti-M sunt de tip IgM la rece și naturali. Ei apar la fenotipul NN și sunt foarte rar incriminați în accidentele posttransfuzionale. Atunci când sunt de tip IgG, ca urmare a unei incompatibilități, pot fi incriminați în accidentele posttransfuzionale și în boala hemolitică a nou-născutului.

Anticorpul anti-N apare mult mai rar decât anti-M, el poate fi de tip IgM și, extrem de rar, IgG.

La bolnavii supuși dializei renale apare un anti-N-*like*, indiferent de fenotipul MN, care poate fi considerat un autoanticorp. Acest fenomen este explicat prin faptul că antigenele MN sunt alterate în timpul expunerii lor la formaldehidă, folosită ca element de sterilizare a aparatelor respective.

Anticorpii anti-S pot fi de tip IgM sau IgG, în timp ce, cei cu specificități anti-s și anti-U sunt numai de tip IgG și pot fi implicați în accidente transfuzionale, boala hemolitică a nou-născutului, iar cei anti-U pot fi uneori întâlniți în anemia hemolitică autoimună de tip la cald.

Semnificația clinică a sistemului MNSsU. Din datele privind anticorpii sistemului MNSsU reiese că el poate fi implicat în accidentele posttransfuzionale și boala hemolitică a nou-născutului, în special atunci când anticorpii prezenți sunt de tip IgG.



100% — toți copiii sunt MN și nu pot fi excluși de la paternitate. Dacă apare un copil MM, acesta este exclus de la paternitate, deoarece un antigen M este luat de la mamă și al doilea de la o altă persoană care are antigenul M.

50% — copiii sunt MN
25% — copiii sunt MM
25% — copiii sunt NN
Pe astfel de model nu apare excluderea de paternitate.

Antigenele MN sunt folosite în special în cercetările de filiație, deoarece sunt caractere bine dezvoltate la naștere și stabile în tot timpul vieții. Excluderea paternității se poate face cu mare siguranță atunci când serurile sunt foarte specifice. De obicei, serurile anti-M și anti-N folosite la determinarea acestor antigene provin din imunizarea iepurilor sau cailor cu eritrocite umane de grup 0, MM și respectiv NN.

Modul după care se face transmiterea ereditară este mendelian. Mai sus, sunt redate două modele din care reiese cum poate apărea sau nu o excludere de paternitate.

Antigenele Ss pot fi folosite în cercetările de filiație, cu condiția ca serurile anti-S și anti-s să fie de foarte bună calitate pentru a oferi siguranță în determinarea antigenului S și s. De obicei serul anti-s este un ser de tip IgG, pentru care trebuie folosit testul Coombs indirect.

SISTEMUL P

A fost descoperit de Landsteiner și Levine în aceeași perioadă când lucrau pentru producerea de seruri anti-M și anti-N. Inițial, autorii au arătat că acest sistem este format din 2 gene alele, genele *P* și *p*. Frecvența factorului P în rasa albă este de 79%, iar a factorului P negativ (p) este de 21%. Genele acestui sistem se găsesc pe cromosomul 22. Cercetări biochimice recente ca și descoperirea la persoane cu fenotipul p a unor anticorpi denumiți anti-Tj^a, au demonstrat că sistemul P are o schemă de sinteză asemănătoare, până la un anumit punct, cu cea a sistemului HAB.

Antigenele sistemului P sunt: P_1, P, P^k și p. Ele sunt glicosfingolipide. La o structură de bază de natură lipidică, care este un paraglobozid, asemănătoare cu cea a antigenelor HAB, se adaugă, sub comanda genelor respective și prin intermediul transferazelor serice, glucidele specifice antigenelor P eritrocitare.

Antigenele P_1 și P au o frecvență mare, de 79% și respectiv de 21%, în populația albă, în timp ce P^k și p sunt extrem de rare.

Antigenul P_1 este cel mai des întâlnit pe eritrocite, leucocite, celule tisulare și liber în anumite secreții. La nou-născut este slab dezvoltat și ajunge la o anumită capacitate antigenică după ani de zile. La adult, unele antigene P_1 sunt considerate P_1-tare și altele, care reacționează mai slab față de același ser anti-P_1, sunt considerate P-slab. El se deteriorează repede prin stocarea sângelui, așa încât determinarea sa trebuie efectuată cu seruri anti-P_1 puternice și pe eritrocite proaspăt recoltate.

Antigenul P se întâlnește la fenotipul P_1 și P_2 și lipsește complet la persoanele cu fenotipul P^k și p. El este fixat pe eritrocite, leucocite, celule tisulare și liber în plasmă. Fenotipul P_2 apare când un ser puternic cu specificitate anti-P_1 este absorbit cu unele eritrocite, etichetate P_2. În urma acestei absorbții, serul va reacționa numai cu eritrocitele P_1 și nu cu P_2. În felul acesta sistemul P poate fi comparat cu sistemul 0AB: serul anti-P_1 este format din anti-P_1+P, exact ca aglutinina alfa care este formată din $alfa_1$+alfa comun, alfa comun fiind absorbit de eritrocitele A_2.

Antigenul P^k este extrem de rar întâlnit. El se determină foarte greu pe eritrocite și mai ușor pe cele tisulare, leucocite și liber în plasmă.

Antigenul p, ca și P^k, au o frecvență extrem de rară și la început s-a crezut că ar fi determinați de o genă amorfă. Descoperirea unor seruri cu specificitate anti-p a demonstrat existența antigenului p.

Antigenul P_1 a mai fost găsit în lichidul chistului hidatic. La persoanele P_2, P sau p el poate provoca apariția de anticorpi anti-P_1.

Substanța P a mai fost găsită la *Fasciola hepatica, Ascaris lumbricoides,* în icrele de păstrăv, somn și la porumbel.

Anticorpii sistemului P. Anticorpii anti-P_1 se întâlnesc des la persoanele cu fenotipul P_2. Cel mai adesea se întâlnesc sub formă de IgM, care fac să aglutineze eritrocitele P_1 în mediu salin și să lege complementul. Rar se pot întâlni și sub forma IgG, cu o scară de aglutinare largă. Bolnavii cu anticorpi anti-P_1, de tip IgM sau/și IgG, trebuie transfuzați cu sânge cu fenotipul P_2.

Anticorpii anti-P, extrem de rar întâlniți, sunt fie de tip IgM, fie IgG, cu putere hemolizantă mare.

Anticorpul anti-Tj^a este un anticorp complex, un anti-PP_1, P^k, care apare aproape în mod regulat la persoanele cu fenotipul p. Poate fi de tip IgM, IgG sau de ambele clase de Ig la aceeași persoană. El fixează complementul și se comportă ca o adevărată hemolizină față de orice antigen P, iar pe țesut ca un anticorp citotoxic.

Importanța clinică a sistemului P. Antigenele sistemului P nu sunt folosite în cercetările de filiație din cauza: variațiilor mari de antigenicitate, de vârstă și de serurile anti-P. Fiind antigene tisulare și leucocitare sunt implicate în problemele de transplantare, mai ales atunci când în serul bolnavului există anticorpi anti-P_1 față de un donator cu antigenul P.

Anticorpii anti-P_1, în special dacă sunt de tip IgG, sunt extrem de rar responsabili ai unor reacții transfuzionale. Anticorpii anti-P, IgM sau IgG dau reacții hemolitice posttransfuzionale, iar în special cei de tip IgG sunt implicați în avorturile spontane. Anticorpii anti-Tj^a sunt fixatori de complement și dau reacții hemolitice grave la persoane ce au primit o transfuzie incompatibilă față de acest anticorp. În cadrul incompatibilității materno-fetale, gravidele pot avea avorturi repetate și nou-născuții boala hemolitică, de la forma blândă până la cea foarte severă. Hemolizinele de tip bifazic Donath-Landsteiner, ca și autoanticorpii din unele cazuri de anemii hemolitice autoimune, sunt anti-Tj^a. De asemenea, fiind anticorpi de tip citotoxic, ei duc la rejecția organului respectiv, dacă el nu este p.

SISTEMUL KELL

Este asemănător cu sistemul Rh în ce privește complexitatea și importanța sa clinică. Antigenul Kell a fost descris în anul 1946, când anticorpii din serul unei femei cu numele Kell, care dăduse naștere unui făt cu boala hemolitică gravă, au fost puși pentru prima dată în evidență prin testul antiglobulinic indirect. Gena corespunzătoare antigenului a fost denumită *K*, iar presupusa ei alelă *k* (Cellano) a fost descrisă în anul 1949. A apărut astfel un nou sistem, Kell-Cellano, care până în prezent cuprinde 21 de antigene. În anii 1957—1958 au fost descoperite alte 2 gene aparținând acestui sistem: Kp^a (Penney) și Kp^b (Rautenberg); iar în anul 1958 a fost descoperit un al treilea cuplu de alele Js^a (Sutter) și Js^b (Matthews). Fenotipurile și frecvențele acestor antigene la populația albă sunt redate în tabelul 15.VIII.

Deşi factorul Kell are o frecvenţă de numai 9%, el este deosebit de important datorită puternicii sale imunogenicităţi, urmând, din acest punct de vedere, imediat după factorul Rho(D). În transfuzii repetate de sânge este indicat ca toţi bolnavii Kell-negativi să fie transfuzaţi numai cu sânge Kell negativ, iar femeile Kell-negative cu soţii Kell-pozitivi, să fie controlate pe parcursul sarcinilor, pentru apariţia aloanti-corpilor anti-Kell.

TABELUL 15.VIII

Fenotip	Frecvenţă (%)
KK	0,2
Kk	8,8
kk	91,0
Kp(a+b—)	<0,1
Kp(a+b+)	2,0
Kp(a—b+)	98,0
Js(a+b—)	0,1
Js(a+b+)	0,1
Js(a—b+)	>99,9

Antigenele Kp^a şi Js^a au o frecvenţă foarte mică, iar k, Kp^b şi Js^b au o frecvenţă foarte mare. Ele pun foarte rar problema aloimunizării.

Fenotipul Ko este determinat de prezenţa unei gene socotită mută sau amorfă în forma homozigotă k^o/k^o. Persoanele care sunt genotipic k^o/k^o nu posedă nici un antigen din sistemul Kell. Ca şi în sistemul Rh, gena k^o este egală cu gena *r*, socotită genă supresoare sau amorfă, care determină fenotipul Rh nul (---/---).

Persoanele care sunt k^o/k^o sunt în mare pericol atunci când sunt transfuzate, la fel ca şi mamele care primesc sânge transplacentar, de la făt, deoarece ele dezvoltă cu mare uşurinţă anticorpi faţă de toate anti-genele din sistemul Kell, în special faţă de antigenele cu frecvenţă foarte mare cum sunt Kell, Cellano, Kpb şi Jsb. Reiese că astfel de persoane nu pot fi transfuzate decât cu sânge ce posedă fenotipul Ko.

Antigenul Kx este singurul antigen din sistemul Kell care se întâl-neşte din abundenţă pe eritrocite atunci când subiectul are fenotip Ko; în schimb, antigenul Kx se găseşte numai sub formă de urme la toate persoanele cu sistemul Kell în stare normală. Această constatare prac-tică a făcut pe unii autori să afirme că antigenul Kx este substanţa fun-damentală pentru toate antigenele Kell. Dacă intervine cel puţin una din genele sistemelor alele *K*, *Kp* sau *Js*, substanţa de bază sau funda-mentală este transformată în antigenul sau antigenele determinate genetic. Aşa se explică de ce o persoană cu fenotipul Ko are o cantitate mare de substanţă Kx. Ea nu poate fi transformată în altă substanţă dacă acţionează o genă mută -k^o. Antigenul Kx este determinat de o genă, numită Xk, linkată de cromosomul X. Fără gena *Xk* şi respec-tiv antigenul Kx, sistemul Kell nu s-ar mai putea manifesta antigenic.

Celelalte antigene, până la 21, sunt majoritatea înrudite cu anti-genul K_o. Legătura genetică a acestor antigene cu fenotipul „null" (K_0 negativ), nu este încă înţeleasă. Marsh şi colab, se referă la antigene

„para-Kell". Ca și în sistemul Rh, Allen și Rosenfield, în 1961, propun o nomenclatură numerică pentru a elimina dificultățile de comunicare privind antigenele acestui sistem. În tabelul 15.IX sunt redate toate antigenele sistemului Kell prin cele 2 nomenclaturi, ca și anul descoperirii lor.

TABELUL 15.IX

Nomenclatura antigenelor din sistemul Kell

Numele original	Termen numeric	Anul descoperirii
K (Kell)	K1	1946
k (Cellano)	K2	1949
Kp^a (Penney)	K3	1957
Kp^b (Rautenberg)	K4	1958
Ko (Peltz)	K5	1957
Js^a (Sutter)	K6	1958
Js^b (Matthews)	K7	1963
K^w	K8	1965
KL (Class)	K9	1965
UI_p	K10	1968
Côté	K11	1971
Bc	K12	1973
Sgro	K13	1974
San	K14	1976
Kx	K15	1975
K-*like*	K16	1975
Wk (Weeks)	K17	1974
—	K18	1975
—	K19	1979
Kp^c (Levay)	—	1979

Antigenele sistemului Kell sunt bine reprezentate la naștere și chiar în timpul vieții intrauterine, explicând severitatea bolii hemolitice a nou-născutului. Cu excepția antigenului Kx, toate celelalte antigene sunt limitate numai la membrana eritrocitului.

În afară de gena *Xk*, așezată pe cromosomul X, poziția celorlalte gene ale sistemului Kell nu este încă precizată. Ele par să fie strâns linkate de genele care controlează gustul la feniltiocarbamidă.

Toate antigenele sistemului Kell sunt codominante. Ca structură chimică, ele sunt glicoproteine, fără să se cunoască determinanții antigenici.

Fenotipul McLeod ($kK_p^bJs^b$). Acest fenotip denumit după numele donatorului la care a fost descoperit, se întâlnește numai la bărbați și este determinat de lipsa substanței fundamentale Kx care împiedică sinteza antigenelor din sistemul Kell sau, uneori, dacă ea se sintetizează, expresia lor este extrem de redusă.

Eritrocitele cu fenotipul McLeod sunt morfologic anormale, ele apărând pe frotiul de sânge colorat Wright sub forma de acantocite. Aceste eritrocite, ca orice eritrocite anormale, au o viață mai scurtă, ele sunt sechestrate în splină și distruse de macrofagele locale. Bărbații cu fenotipul McLeod au o anemie hemolitică cronică compensată, iar acest tip de boală a fost denumit sindromul McLeod.

Cum în mod obișnuit antigenul Kx se găsește și pe celulele seriei albe, lipsa lui determină o serie de tulburări care, toate la un loc, realizează o trăsătură comună, și anume incapacitatea leucocitelor de a distruge anumite microorganisme. Lipsa antigenului Kx de pe membrana monocitelor și neutrofilelor determină așa-numita boală granulomatoasă cronică.

Antigenele sistemului Kell par a fi necesare unei structuri normale a eritrocitului și unei funcții normale a leucocitului.

Anticorpii sistemului Kell. Majoritatea anticorpilor din sistemul Kell-Cellano sunt de tip imun; mai des se întâlnește specificitatea anti-Kell și foarte rar se întâlnesc celelalte specificități. Anticorpii de tip imun sunt de tip la cald incompleți, IgG și se pun în evidență prin testul antiglobulinic. Ei apar ca urmare a transfuziilor și a sarcinilor incompatibile, putând determina accidente transfuzionale grave sau boala hemolitică severă a nou-născutului. Foarte rar anticorpii fixează complementul ca atare și eritrocitele sensibilizate cu anticorpi sunt sechestrate extravascular, în splină și hemolizate de macrofage. Au fost citați anticorpi de tip natural anti-Kell, aceștia fiind, de fapt, apăruți ca urmare a unor infecții cu *E. coli* 0 125. Acești aloanticorpi de tip „natural" sunt IgM.

Aproximativ la un caz din 250 au fost găsiți bolnavi cu diagnosticul de anemie hemolitică autoimună cu autoanticorpi în cadrul sistemului Kell, în special anti-K și anti-Kp^b. Acest lucru se explică printr-o depresie temporară a acestor antigene determinată de o cauză bacteriană, ceea ce induce unele modificări ale membranei eritrocitare, respectiv și ale antigenelor sistemului Kell. Astfel, sistemul formator de anticorpi nu mai recunoaște antigenele respective, ceea ce are drept consecință formarea de autoanticorpi, cu specificitate anti-Kell.

SISTEMUL DUFFY

Acest sistem a fost descoperit în 1950 de către Cutbush, care a cercetat anticorpii prezenți în serul unui bolnav politransfuzat, numit Duffy. Cutbush a descris antigenele Fy(a) și Fy(b), produse ale unor gene alele. În funcție de prezența sau absența unei alele sau a ambelor, în populația albă s-au deosebit următoarele fenotipuri: Fy(a+b+), Fy(a+b—) și Fy(a—b+). În populația de culoare neagră s-a găsit fenotipul Fy(a—b—), într-o frecvență de aproximativ 80%, care, la populația albă, este o raritate.

După anii 1970, prin intermediul anticorpilor omologi, au mai fost descrise încă alte 3 antigene: Fy 3, Fy 4 și Fy 5.

O caracteristică importantă care deosebește primele 2 antigene de ultimele 3 descoperite este faptul că antigenele Fy(a) și Fy(b) sunt degradate de enzimele proteolitice, în timp ce Fy 3, Fy 4 și Fy 5 sunt rezistente când sunt supuse unor acțiuni enzimatice.

Antigenul Fy 3 deși pare să fie o entitate deosebită, însoțește totdeauna fie antigenul Fy(a), fie Fy(b) dar nu se găsește niciodată la persoanele cu fenotipul Fy(a—b—). Anticorpii anti-Fy 3 reacționează cu fenotipurile Fy(a+b—), Fy(a—b+) și nu reacționează cu fenotipul Fy(a—b—).

Antigenul Fy 4 se găseşte, în mod constant, la persoanele care sunt Fy(a—b—). Această constatare a făcut pe unii autori să creadă că antigenul Fy 4 este determinat de o alelă a genei Fy^3, sau o alelă la locusul Fy^a Fy^b. Anticorpii anti-Fy 4 reacţionează, în mod constant, cu fenotipul Fy(a—b—) şi numai cu unele din fenotipurile Fy(a+b—) sau Fy(a—b+), de unde reiese că genotipul poate fi frecvent sub forma Fy^4Fy^4 şi rar Fy^aFy^4 sau Fy^bFy^4.

Antigenul Fy 5 pare să fie rezultatul unei relaţii genetice dintre locusul sistemului Duffy şi Rh. El apare prezent la fenotipul Fy(a+b—), Fy(a—b+) şi este totdeauna absent la persoanele cu fenotipul Fy(a—b—).

Legătura dintre antigenul Fy 5 şi Rh constă în aceea că el este absent la toate persoanele care sunt Fy(a—b—), negativ Fy 4 şi Rh nul, de unde reiese că el se construieşte pe baza existenţei unor substanţe de bază a sistemelor Duffy şi Rh. Toate persoanele care sunt Fy 5 negative au proprietatea de a forma foarte uşor anticorpi anti-Fy 5.

Relaţia găsită între sistemul Rh şi antigenul Fy 5 a făcut să se stabilească faptul că genele sistemului Duffy sunt fixate pe perechea de cromosomi nr. 1, pe care se află şi genele care comandă sistemul Rh.

Antigenele sistemului Duffy apar devreme în viaţa fetală şi sunt bine dezvoltate la naştere. Antigenele Fy^a şi Fy^b sunt probabil de natură proteică şi de aceea ele sunt distruse enzimatic. Ca atare, ele nu pot fi puse în evidenţă prin metode care folosesc papaina, bromelina, ficina, ci numai prin testul antiglobulinic.

Anticorpii sistemului Duffy sunt numai de tip imun şi totdeauna de tip IgG, putând fi evidenţiaţi prin testul antiglobulinic indirect. Ei pot fi responsabili de accidente posttransfuzionale de tip hemolitic şi mai rar (anti-Fya) de boala hemolitică a nou-născutului.

Importanţa sistemului Duffy. Din punct de vedere genetic, sistemul Duffy, ca şi sistemul Rh, contribuie la cartarea cromosomului nr. 1.

Frecvenţa diferită a fenotipurilor din sistemul Duffy [Fy(a+b—) 18%, Fy(a+b+) 48% şi Fy(a—b+) 33%] face să apară în special anticorpi cu specificitate anti-Fya de tip IgG implicaţi în accidentele posttransfuzionale de tip hemolitic şi în boala hemolitică a nou-născutului.

Un aspect important, elucidat de lucrările lui Miller şi colab., este cel al legăturii dintre sistemul Duffy şi malarie. Prezenţa fenotipului Fy(a—b—) într-o frecvenţă de 80% în populaţia neagră reprezintă un exemplu de selecţie naturală. Factorii Fy(a) şi Fy(b) din fenotipurile Fy(a+b—) şi Fy(a—b+) de pe eritrocite au constituit şi mai constituie încă poarta de intrare în eritrocite a paraziţilor *Plasmodium vivax* şi *Plasmodium knowlesii*. Aceşti paraziţi nu sunt însă găsiţi la subiecţii cu fenotipul Fy 4 [Fy(a—b—)], care reprezintă pentru ei un element de rezistenţă totală.

SISTEMUL LUTHERAN

A fost descris, în anul 1945, de către Callender şi colab. Autorii respectivi descoperă un nou anticorp care nu se asocia cu nici unul dintre sistemele descrise până atunci şi pe care îl denumesc anti-Lua.

Acest anticorp corespundea antigenului Lu(a+); ulterior, s-a descris încă un alt anticorp, denumit anti-Lub. Cu ajutorul celor 2 specificităţi au fost precizate următarele fenotipuri în sistemul Lutheran: Lu(a+b—), Lu(a—b+), Lu(a+b+) şi Lu(a—b—). În populaţia albă, factorul Lu(a+) are o frecvenţă de aproximativ 8%, iar Lu(b+) peste 99%. Din 1945 au mai fost descoperite aproape 20 de noi alte antigene, toate cu o frecvenţă mare. Fenotipul Lu(a—b—) a fost luat în consideraţie datorită absenţei de aglutinine a unor eritrocite faţă de serurile monospecifice anti-Lu(a) şi anti-Lu(b). Prezenţa extrem de rară a fenotipului Lutheran s-ar datora la două mecanisme genetice, şi anume: fie că pentru locusul Lutheran există o genă dominantă inhibitoare, numită *In(Lu)*, care segregă independent şi care împiedică manifestarea uneia sau ambelor gene Lu^a şi Lu^b, fie că la locusul Lutheran există o genă mută, denumită *Lu* şi care, în forma sa homozigotă, produce fenotipul Lu(a—b—). Această formă, foarte rară, Lu(a—b—), determinată de un genotip mut (Lu/Lu) a mai fost numită şi Lu nul.

Anticorpii anti-Lutheran. Anticorpii anti-Lu(a) apar, de obicei, ca aglutinine care reacţionează în mediu salin, de tip IgM, numai la unele persoane care sunt Lu(a—). Rareori ei pot fi şi de tip la cald, incompleţi, cu specificitatea imunochimică IgG sau IgA. Când aceşti anticorpi fixează complementul pot da reacţii transfuzionale de tip hemolitic.

Anticorpii anti-Lu(b) sunt, în general, de tip IgG şi IgA şi mai rar IgM. Ei apar extrem de rar din cauza frecvenţei factorului Lu(b) care este de aproape 100%.

Anticorpii anti-Lu 3 apar la toate persoanele care au fenotipul Lu(a—b—). Aceşti anticorpi sunt IgG şi IgA, cu capacitatea de a distruge eritrocitele incompatibile Lu(a+b—), Lu(a—b+) şi Lu(a+b+) şi sunt nereactivi faţă de eritrocitele ce au fenotipul Lu(a—b—).

SISTEMUL KIDD

Acest sistem a fost descoperit în 1951 la un copil ce suferea de boală hemolitică. La început a fost identificat factorul Jka şi apoi Jkb. Genele respective sunt alele codominante, care determină următoarele fenotipuri: Jk(a+b—) cu o frecvenţă de 28%, Jk(a—b+) cu frecvenţa de 23% şi Jk(a+b+) cu frecvenţa de 49%. În câteva cazuri, şi numai în Filipine, a fost descris şi fenotipul rar Jk(a—b—) sau Kidd nul explicat, ca şi la sistemul Lutheran, fie prin existenţa unei gene supresoare, fie prin existenţa unei gene amorfe, Jk, în forma ei homozigotă, care ar împiedica exprimarea pe eritrocit a antigenelor Jk(a) şi Jk(b).

Antigenele Kidd sunt bine dezvoltate la naştere şi suficient de imunogene, astfel încât ele contribuie la incidenţa bolii hemolitice a nounăscutului.

Anticorpii anti-Kidd. Anticorpii anti-Jk(a) şi anti-Jk(b) sunt de tip imun de tip IgG, fixatori de complement. Ei pot apărea prin incompatibilitate de sarcină, dând boala hemolitică a nou-născutului, sau prin incompatibilitate transfuzională, provocând accidente posttransfuzionale de tip hemolitic întârziat. Cercetarea acestor anticorpi trebuie făcută

pe ser proaspăt, pentru a se putea obține rezultate concludente. Persoanele cu fenotipul Jk(a—b—) produc un anticorp particular, numit anti-Jk_3, care reacționează cu toate cele 3 fenotipuri Kidd, dar nu reacționează cu fenotipul Jk(a—b—).

Anticorpii sistemului Kidd se perimează *in vitro* foarte repede și pot da reacții fals negative. *In vivo*, după o anumită perioadă de timp, titrul lor poate să scadă și să nu se obțină rezultatele reale. Ca atare, un bolnav care este imunizat față de unul din factorii sistemului Kidd trebuie să fie notat cu multă atenție, pentru a nu se mai repeta o transfuzie incompatibilă.

SISTEMUL Ii

În 1950, Wiener descoperă un nou sistem, pe care îl denumește I de la cuvântul „individualitate", deoarece, deși comun, el este în același timp heterogen, particular pentru fiecare persoană. Autorul a constatat că antigenul I are o frecvență de 100%. Din 22 964 probe de sânge, luate de la adult și puse în contact cu un ser anti-I, numai 5 au fost găsite negative. Autorul a considerat cele 5 probe ca fiind I negativ și i adult. Eritrocitele de adult conțin o cantitate semnificativă de substanță I, dar și o cantitate foarte mică de substanță i, care nu poate fi ușor detectată. Spre deosebire de sângele de adult, sângele de cordon, deci de nou-născut, este bogat în substanțe i. Acest antigen i se transformă ulterior în substanță I, astfel că la 18 luni aceasta ajunge la concentrația întâlnită la adult.

Ținându-se seama de modul de transformare a antigenului de la nou-născut pe parcursul înaintării în vârstă în I și de rezultatele foarte diferite de la un sânge de adult la altul, privind antigenul I, se consideră că la formarea acestor antigene concură mai mult decât cele 2 gene denumite inițial I și i. Aceste supoziții au fost întărite și de faptul că sunt diferiți atât anticorpii anti-I și anti-i, cât și glicozil transferazele, care atașează diverse glucide pentru formarea antigenelor i și I. Este de reținut că, în cadrul acelorași familii, există aceleași forme antigenice.

Din punctul de vedere al structurii biochimice, între antigenele sistemului 0AB și Ii există o strânsă legătură. Ambele sisteme au ca bază chimică aceleași lanțuri glicolipidice pe care sunt atașate, sub comanda genelor specifice și a enzimelor serice, glucidele specifice pentru fiecare antigen H, A, B, i și I.

Antigenele i și I au fost găsite (ca și antigenul HAB) pe leucocite, trombocite, toate țesuturile, în plasmă și secreții. Laptele uman este bogat în substanță I.

Celulele mature ale măduvei osoase, care sunt în activitate mitotică chiar dacă aparțin adultului, conțin o cantitate mare de antigen i. Acest lucru a fost observat și la celulele tinere din sângele periferic, în anumite boli de sânge. În mononucleoza infecțioasă, limfocitele reactive au o cantitate mare de antigen i.

Anticorpii din sistemul Ii sunt de tip natural (IgM), rar de tip imun (IgG) și pot fi nepatogeni sau patogeni.

Anticorpii nepatogeni apar la persoanele sănătoase, în titru mic, de cel mult 1/32, se manifestă ca autoanticorpi la temperatura camerei şi mai ales la +4°C. Acest autoanticorp la temperatura corpului este inactiv. Anticorpii anti-i se întâlnesc destul de rar, în mod normal, şi mai des apar secundar în infecţii virale, în special cu virusurile citomegalic şi Epstein-Barr (mononucleoza infecţioasă). Acţiunea anticorpului poate fi întâlnită foarte rar în anemiile hemolitice autoimune, el fiind pus în evidenţă cu eritrocite de cordon.

Anticorpii cu specificitate anti-I se întâlnesc mai des, atât la normali, cât şi la bolnavi. Persoanele adulte cu antigenul i formează un aloanti-I care este mai puternic decât un autoanti-I. Aloanti-I are un prag termic mai înalt şi, în caz de transfuzii, dă reacţii grave. Pentru astfel de bolnavi, sângele cel mai potrivit este cel etichetat „i adult". Când titrul autoanticorpilor depăşeşte 1/32, ei sunt consideraţi patogeni şi se manifestă ca autoanticorpi. Uneori, titrul poate ajunge la sute de mii, chiar şi un milion. Aceşti autoanticorpi fixează complementul şi, în caz de transfuzii, ei pot determina accidente grave. Ei se pun uşor în evidenţă, determinându-se titrul cu eritrocite de adult şi de cordon, în mediu salin sau albuminos.

Deoarece antigenele sistemului Ii sunt, din punct de vedere structural, înrudite cu sistemul 0AB, Lewis şi Pp, autoanticorpii anti-I sunt uneori foarte complecşi ca anti-IH, ILe, IP. Unii autori au întâlnit combinaţii şi mai complexe ale autoanticorpilor anti-I, anti-H, anti-A şi -B, în funcţie de grupul bolnavului.

Trebuie subliniat că, deoarece antigenul I se găseşte atât pe leucocit, cât şi pe trombocit, autoanticorpii anti-I pot duce la aglutinarea şi citoliza acestor celule în condiţii patologice.

Importanţa sistemului Ii a fost subliniată în transfuzia de sânge în cazul unor hemopatii, în special în studiul anemiilor hemolitice autoimune de tip rece, pentru specificitatea autoanticorpilor şi în cercetările genetice, datorită particularităţilor interesante pe care aceştia le prezintă.

GRUPELE TROMBOCITARE

Trombocitele posedă pe suprafaţa lor atât antigene comune cu cele ale eritrocitelor şi leucocitelor, cât şi altele specific trombocitare.

Sistemul 0AB şi factorul Rho(D) sunt bine reprezentaţi pe suprafaţa trombocitelor, astfel că pentru grupele sanguine 0AB şi factorul Rho(D) trebuie respectată totdeauna compatibilitatea transfuzională a concentratelor trombocitare. Antigenele sistemului Ii, P şi Le^a sunt, de asemenea, existente, iar prezenţa celor ale sistemului MN este discutabilă.

Antigenele, cele ale locusurilor A, B şi C ale sistemului HLA sunt bine exprimate pe trombocit; antigenul locusului D este posibil să lipsească sau să fie slab exprimat. Şapte sisteme sunt identificate până în prezent ca fiind specifice trombocitului. Noua terminologie internaţională se referă la *„Human platelet antigens"* sau HPA. Aceste sisteme sunt: HPA-1 (fostul PLA sau ZW), HPA-2(Ko), HPA-3(Bak), HPA-4(Pen),

HPA-5(Hc), HPA-6(Nak) și al 7-lea sistem — PLE, care nu este încă clasificat. Sistemul PLA sau ZW a fost descoperit de Van Loghem în 1959. El are 2 alele, $PLA^1(Zw^a)$ și $PLA^2(Zw^b)$. Gena PLA^1 are o frecvență mare, în timp ce PLA^2 este rar întâlnită.

Ulterior, Van Loghem, Van der Weerdt și Shulman descriu celelalte două sisteme, numite PLE și Ko.

Sistemul PLE are 2 alele, PLE^1 și PLE^2. Gena respectivă antigenului PLE^1 are o frecvență extrem de mare, în timp ce PLE^2 are frecvența foarte mică. Sistemul Ko are 2 alele Ko^a și Ko^b, prima cu frecvență mică și a doua cu frecvență mare.

Cercetările familiale făcute au demonstrat că genele acestor sisteme se transmit ereditar, după legile lui Mendel.

Anticorpii antitrombocitari. Prezența anticorpilor antitrombocitari a făcut posibilă descrierea grupelor trombocitare. Ei au fost găsiți la lăuzele care au dat naștere la feți cu trombocitopenii neonatale și la bolnavi cu transfuzii în antecedente. Anticorpii antitrombocitari sunt de tip IgG 7S, traversează placenta de la mamă la făt, antrenând distrugerea trombocitelor fătului și nou-născutului. Apare, astfel, o trombocitopenie în primele 24 de ore după naștere, care se relevă prin peteșii și/sau hemoragii, mai mari sau mai grave și cu un număr de trombocite sub 50 000/mm^3.

Purpura posttransfuzională este un sindrom trombocitopenic, care apare la 5—10 zile după transfuzii. Numărul de trombocite poate fi mai mare de 10 000/mm^3. Shulman afirmă că din 100 bolnavi care au primit 1—10 transfuzii, se imunizează un număr de 5, cei care primesc 25—50 de transfuzii se imunizează în proporție de 24%, iar cei cu peste 100 de transfuzii în proporție de 80%. Specificitatea anticorpilor este, în general, anti-PLA^1. Ei apar la persoanele PLA^2/PLA^2. În ceea ce privește sistemul PLE, a fost descrisă până acum o singură persoană PLE^2 care a format anticorpi anti-PLE^1.

Anticorpii sistemului Ko apar, în general, la politransfuzați, la cei cu fenotipul Ko(a), care primesc transfuzii cu factorul Ko(b).

Anticorpii sistemului Ko sunt de natură IgM. Aceștia din urmă sunt întovărășiți și de anticorpi antileucocitari din sistemul HLA. Anticorpii antitrombocitari se pun greu în evidență; tehnica folosită este trombo-aglutinarea pentru anticorpii de tip IgM, iar pentru cei de tip IgG, se utilizează tehnica de fixare a complementului, de consum de ser antiglobulinic, tehnici cu anticorpi marcați cu fluoresceină sau de tip ELISA.

SISTEMELE SERICE

În ultimii 40 de ani, odată cu descoperirea haptoglobulinelor (Hp), a reieșit că proteinele plasmatice prezintă variații controlate genetic, care se transmit din generație în generație. În afară de sistemul Hp, azi se mai cunosc următoarele sisteme: alotipurile lanțurilor grele și ușoare, transferinele, grupele Gc, grupele lipoproteinice (sistemele Ag și Lp).

Haptoglobulinele au fost descoperite în 1955 de către Smithies. Ele se determină prin electroforeză și migrează mai lent sau mai rapid, în funcție de greutatea lor moleculară. Hp sunt alfa 2-globuline. Se cunosc

trei tipuri fenotipice: Hp(1—1), Hp(2—2), determinate de 2 gene alele ale aceluiași locus, Hp^1 și Hp^2. Cazuri foarte rare de ahaptoglobulinemie au fost întâlnite la populațiile de culoare neagră. Aceste cazuri presupun existența unei gene mute, numită Hp^0. Cazurile de ahaptoglobulinemie aparțin genotipului Hp^0/Hp^0. Din punct de vedere fiziologic, haptoglobulinele sunt sintetizate de ficat, au rolul să fixeze hemoglobina rezultată din hemoliză și sunt eliminate la nivelul sistemului reticuloendotelial. Concentrația serică variază în funcție de genotipul individual de la 40 la 180 mg/100 ml ser. În afară de ser, Hp mai pot fi decelate în limfă, urină și alte lichide organice.

Alotipurile sunt markeri genetici ai Ig, care determină variații de la individ la individ, în cadrul aceleiași specii. Aceste variații se transmit de la o generație la alta în grup, alcătuind un haplotip, ceea ce presupune că genele sunt strâns legate unele de altele pe același cromosom. Sistemele alotipice cunoscute sunt Gm, ISf, Km(InV) și A_2M. Metoda de evidențiere a acestor markeri sau factori genetici este inhibohemaglutinarea, tehnică în care se folosesc eritrocite sensibilizate cu alotipul urmărit, față de un ser ce conține anticorpi antialotipul omolog. Sistemul Gm (gama) cuprinde 25 de factori numerotați de la 1 la 25; el a fost descoperit de Grubb și Laurell în 1956. Variațiile alotipice Gm sunt determinate de variațiile în aminoacizi din lanțurile grele: γ_1, γ_2 și γ_3.

Sistemul ISf are un singur factor (numit ISf_1), care este specific numai pentru subclasa IgG_1 și independent de celelalte sisteme. Acest factor ISf(1) prezintă particularitatea de a crește în frecvență odată cu vârsta: la copii frecvența este de 25%, la adult de 40%, iar la persoanele de peste 70 de ani de 60%.

Sistemul Km (InV) are trei alotipuri pentru specia umană. Ele sunt localizate pe partea constantă a lanțurilor ușoare, de tip kappa. Cei trei factori sunt: Km(1), (2) și (3). S-a demonstrat că factorul Km(1) are valină în poziția 153, iar în poziția 191 leucină. Când subiectul este Km(2), în poziția 153 se găsește alanina, iar când are gena Km(3), în poziția 153 se găsește alanina și în 191, valina.

Descoperirea alotipurilor sistemelor Gm și InV demonstrează că cel puțin în cazul structurii IgG și a lanțurilor Kappa, variațiile sunt atât de mari, încât s-a ajuns să se vorbească de o individualitate biologică. Factorii Gm și Km sunt folosiți în cercetările medico-legale și de filiație, sunt corelați cu anumite stări patologice și au permis unele precizări interesante asupra funcționalității limfocitului de tip B.

Lucrări antropologice de o deosebită importanță au arătat că frecvența unor factori prezintă variații evidente de la o rasă la alta și chiar în cadrul aceleiași rase.

La noi în țară, studiul frecvenței factorilor Gm(1) 34,45% Gm(2) 5,06%, Gm(5) 95,81% și Km(1) 11,54% a demonstrat că populația țării noastre se încadrează în contextul frecvențelor obținute pentru Europa de Sud-Est.

Sistemul A_2m, descoperit de Vya și colab. în 1968, este un sistem simplu, format numai din 2 factori: $A_2m(1)$ și $A_2m(2)$. Prezența acestor factori este determinată de diferențele calitative ale aminoacizilor din șanțurile polipeptidice alfa-2. Identificarea acestui sistem a permis elu-

cidarea unor reacții posttransfuzionale de tip anafilactic, atunci când bolnavul are anticorpi anti-Am(1) sau anti-Am(2) și primește plasmă incompatibilă.

Transferinele (siderofilinele) sunt beta-globuline sintetizate de ficat. Ele au rolul de a transporta fierul seric în organism. O moleculă de transferină leagă 2 atomi de fier, formând astfel un complex foarte stabil între pH 7,2 și 10. Cantitatea normală de siderofilină la un adult este de 200—320 µg/100 ml ser, determinată prin electroforeză. Transferinele sunt determinate genetic, după viteza de migrare. Se cunosc trei tipuri: B, C și D. Tipul B are, până în prezent, descoperite 6 alele, iar tipul D, aproximativ 7. Giblett recunoaște aproximativ 28 de fenotipuri, de unde reiese că transferinele sunt foarte polimorfe. La rasa albă, transferinele sunt de tip C.

Sistemul Gc a fost descoperit de Hirszfeld în 1959. Simbolul Gc provine de la prescurtarea cuvintelor *„Group specific component"*. Imunoglobulinele aparținând acestui sistem sunt alfa-2 globuline, iar din punct de vedere genetic se aseamănă cu Hp.

Se cunosc 2 gene autosomale — Gc1 și Gc2 — care determină 3 fenotipuri: Gc(1—1), Gc(2—2) și Gc(1—2).

Grupele lipoproteinice formează 2 sisteme: Ag și Lp. Lipoproteinele au rolul de transport al lipidelor (vitamine și hormoni liposolubili, fosfolipide, colesterol și gliceride). Absența lor congenitală determină o deformare a eritrocitelor numită acantocitoză.

Sistemul Ag este un sistem polimorf, asemănător sistemului Rh. Factorii recunoscuți sunt Ag^{a1}, Ag^{x}, Ag^{y}, Ag^{z}, Ag^{t} etc.

Sistemul Lp este independent de sistemul Ag. El are 2 alele, Lp^{a} și Lp^{x}, determinând 3 fenotipuri: Lp(a+x—), Lp(a+x+) și Lp(a—x+). Grație diferențelor fenotipice, ca urmare a unor transfuzii de plasmă incompatibilă, pot să apară anticorpi anti-Lp.

BIBLIOGRAFIE

1. ADDINE G.: The principles and practice of blood grouping. Edit. C. V. Mosby Co., Saint-Louis, 1973.
2. APĂTEANU V., DANIELESCU M.: Doc. Haemat. 1973; 2: 105.
3. ATKINSON J. B., TANLEY P. C., WALLAS C. H.: Transfusion 1987; 27: 45.
4. BERNARD J., RUFFIE J.: Hématologie géographique, écologie humaine, caractères héréditaires du sang. Masson et Co., Paris, 1966.
5. CEPELLINI R.: Proc. 5-th Congr. Int. Soc. Blood Transf., Paris, 1955.
6. CHENG M. S.: Transf. 1985; 25: 88.
7. COWLES J. W., SPITALNIK S. L., BLUMBERG N.: Vox sang. 1989; 56: 107.
8. DANIELESCU M. L.: Rev. fr. Transf. 1970; 13: 97.
9. DANIELESCU M. și colab.: Doc. Haemat. 1972; 2: 107.
10. DANIELESCU M. și colab.: Al 17-lea Congr. Int. Transf., Budapesta, 1982.
11. DANIELESCU M.: Contribuții la studiul sistemelor serice Gm și InV în România. Teză de doctorat, I.M.F. București, 1975.
12. DELANEY J. W.: Handbook of haematological and blood transfusion technique. Edit. Butterworth, Londra, 1960.

12a. DEMBORNE A. E. G., De CARRY F.: Transfusion 1990; 30: 477.

13. DUNSFORD I., BOWLEY C.: Richerche sui gruppi sanguini, Edit. Pasiera Sci., Roma, 1970.
14. GENETET B., MANNONI P.: La transfusion. Edit. Flammarion, Paris, 1978.

15. GINGOLD N.: Transfuzia de sânge. Edit. Imprimeria Națională, București, 1940.
16. HEAL J. M., MULLIN A.: Transfusion 1989; 29: 514.
17. ISSITT D. P.: Applied blood group serology. Edit. Becton Dickinson & Co., Londra, 1970.
18. KONDI V., BĂLAN ȘT., MITRICĂ N.: Boala hemolitică a nou-născutului. Edit. Medicală, București, 1975.
19. LOPEZ M., DANIELESCU M. și colab.: Vox sang. 1975; 45: 463.
19a. MARSH W. L.: The Kell Blood group. Spectra Biol., New York, 1989.
20. MAX E. E.: Fundamental Immunology. Raven Press, New York, 1989.
21. MOLLISON L. P.: Blood transfusion in clinical medicine. Blackwell Sci. Publ., Oxford, Edinburg, 1967.
22. MOURANT E. A., KOPEC C. A., DOMANIEWSKA-SOBCZAK K.: Blood groups and diseases. A study of associations of diseases with blood groups and other polymorphism. Oxford University Press, 1978.
23. NICOLAU T. C., DANIELESCU M. și colab.: Doc. Haemat. 1966; 2: 191.
24. PITTIGLIO D. H.: Modern blood banking and transfusion practices. Edit. F. A. Davis, Philadelphia, 1983.
25. PETZ D. L., SCOTT N. S.: Clinical practice of blood transfusion. Edit. Churchill-Livingstone, New York, 1989.
26. RACE R. R., SANGER R.: Les groupes sanguins chez l'homme. Masson & Co., Paris, 1971.
26a. SALMON C. H. și colab.: Les groupes sanguins chez l'homme. Masson & Co., Paris, 1991.
27. STEINBERG A.: Geogr. Med. Genet. 1960; 3: 1.
28. OPROIU C., DANIELESCU M. și colab., Congr. mondial de gastroenterologie, Praga, 1968.

XVI

SISTEMUL HLA

DOINA ILINCA

Pe suprafața celulelor nucleate din organism există structuri antigenice care conferă individualitatea biologică a fiecărui organism, structuri ce variază de la un subiect la altul și care alcătuiesc *Sistemul sau Complexul Major de Histocompatibilitate* (CMH) denumit la om sistemul HLA și la șoarece sistemul H-2. Aceste sisteme au mai fost definite și ca ansamblul de gene situate pe brațul scurt al cromosomului 6 la om și pe cromosomul 17 la șoarece, care codifică moleculele implicate în diverse aspecte ale răspunsului imun. Sistemul HLA este sistemul de gene cel mai polimorf identificat până în prezent.

Definiției genetice a CMH i s-a opus o definiție funcțională: CMH este un grup de locusuri ce codifică proteinele care furnizează un context recunoașterii de antigene de către limfocitele T. În acest sens, numai locusurile pentru clasele I și II ar face cu adevărat parte din CMH. Moleculele codificate de CMH joacă un rol de importanță majoră în diferențierea între „self" și „nonself" de către sistemul imun.

Determinarea antigenelor HLA este relativă nouă și în plină dezvoltare datorită aplicării sale largi în transplantarea de organe și țesuturi, în compatibilitatea transfuzională, corelarea cu diferite boli, teste de paternitate, studii antropologice și populaționale etc.

Antigenele sistemului HLA au fost identificate inițial cu seruri obținute de la bolnavii politransfuzați și ulterior de la femei multipare.

Ele sunt răspândite pe cele mai multe celule din organism și au rol determinant în respingerea allografelor, de unde și denumirea lor ca antigene de histocompatibilitate. Ele sunt cauza principală a distrugerii plachetelor și leucocitelor transfuzate la primitori imunizați. Descoperirea relațiilor care există între antigenele HLA și diferite boli a sporit interesul pentru acest sistem, deși nu este demonstrat că genele HLA sunt gene de susceptibilitate la boală.

Mai recent s-a stabilit că antigenele de histocompatibilitate au un rol important în reglarea răspunsului imun. Recunoașterea antigenului,

cooperarea celulară, fenomene de autoimunitate sunt reglate în parte și de produșii sistemului de histocompatibilitate HLA (7, 36, 38).

Antigenele HLA sunt determinanți majori ai răspunsului imun, capabili să inițieze și să moduleze răspunsul față de antigene străine (16).

Descrierea antigenelor HLA a beneficiat de prezența lor pe leucocite și plachete, ceea ce a ușurat considerabil studiile serologice prin metode universale.

Alături de metodele serologice, studii biochimice și celulare au reprezentat o etapă importantă în cunoașterea acestui sistem polimorf.

Tehnicile de biologie moleculară, studiind genele de pe cromosomul 6 care codifică antigenele HLA, au confirmat și explicat natura acestui polimorfism.

Istoric. Primele studii ale CMH au fost efectuate la animale, în special la șoareci.

În urmă cu peste 50 de ani, Peter Gorer a identificat la aceștia din urmă, un antigen de grup sanguin pe care l-a numit „antigenul 2". Ulterior, prin grefe de tumori, s-a demonstrat că acest antigen are rol în transplantare, de unde și denumirea de „antigen de histocompatibilitate" (histo=țesut), iar sistemul s-a numit H-2.

George Snell și colaboratorii au extins aceste studii descriind numeroase alele ale acestui sistem. Ele se găsesc în principal pe globulele roșii, dar și pe leucocite și alte țesuturi.

La om, primele leucoaglutinări imunologice au fost descrise, începând cu 1952, de către Dausset. Studiind sistematic seruri de la persoane politransfuzate, el evidențiază în 1958 primul antigen leucocitar denumit Mac (în prezent HLA-A2), aparținând sistemului denumit Hu-1, apoi HL-A (*Human Leukocyte,* iar A — pentru primul sistem), iar astăzi HLA *(Human Leukocyte Antigens).*

O etapă importantă în studierea sistemului HLA au reprezentat-o lucrările lui Van Rood, Payne și colab. (1958), care au descoperit — independent unul de altul — frecvența mare a anticorpilor antileucocitari în serul gravidelor multipare. În anii 1960—1961, Friedman și Rapapport descriu rolul antigenelor și anticorpilor HLA în respingerea grefelor de piele. Introducerea, în 1963, a ordinatoarelor în analiza serurilor HLA a dus la înțelegerea reacțiilor serologice deosebit de complexe ale acestui sistem. Astfel sunt descrise două entități serologice, 4a și 4b, ulterior Bw4 și Bw6, care au avut o contribuție deosebit de importantă în definirea antigenelor acestui sistem.

Un pas deosebit de important în testarea antigenelor HLA l-a constituit introducerea, în 1964, a tehnicii de microlimfocitotoxicitate de către Terasaki și Mc Clelland, tehnică foarte sensibilă și reproductibilă, care a dus rapid la dezvoltarea pe scară largă a testării antigenelor HLA, testare numită tipizare sau tipare HLA.

În istoricul descrierii antigenelor HLA, anul 1964 marchează debutul unei largi colaborări internaționale în cadrul unor „ateliere de lucru" *(Workshops),* inițiate de către Amos, colaborare care se menține și astăzi. În 1974 s-a descoperit că anumite antigene HLA sunt asociate cu anumite boli specifice și s-a arătat că sistemul HLA reglează anumite aspecte ale răspunsului imun.

În tabelul 16.I sunt trecute principalele probleme studiate în cele 11 *workshops* ținute până în prezent, așa cum au fost sintetizate recent de Terasaki [cit. în (16)].

TABELUL 16.I

Conferințe internaționale *(workshops)* **în domeniul HLA**
(după Terasaki și colab. — 1990 în „Ten Recollections") (citat de 16)

Anul	Locul	Nr.	Problemele discutate
1964	Washington DC (SUA)	I	— compararea tehnicilor de lucru — demonstrarea testului culturii mixte de limfocite (MLC) și a reacției de citotoxicitate
1965	Leiden (Țările de Jos)	II	— standardizarea tehnicilor — un singur sistem cu 2 locusuri
1967	Torino (Italia)	III	— studii familiale — noțiunea de „dezechilibru de legare" — terminologia reținută: HL-A
1970	Los Angeles (SUA)	IV	— trimiterea de seruri prin poștă — adaptarea reacției de microcitotoxicitate — evidențierea celui de-al 3-lea locus: C
1972	Paris/Evian (Franța)	V	— analiza a 56 de populații diferite — încercări de identificare a locusului C — demonstrarea testului de citoliză mediată celular (CML)
1975	Aarhus (Danemarca)	VI	— identificarea unui locus „DR" analog cu Ia murin — teste celulare: seria D
1977	Oxford (Anglia)	VII	— identificarea antigenelor DR — terminologia HLA-A, B, C
1980	Los Angeles (SUA)	VIII	— identificarea DR 52, 53 și DQ — HLA și transplantarea
1984	München/Viena (Germania/Austria)	IX	— introducerea tehnicii RFLP și a anticorpilor monoclonali — identificarea DP — înțelegerea regiunii „D"
1987	New York (SUA)	X	— tehnica RFLP: standardizare — studii biochimice — introducerea de oligonucleotide — structura tridimensională a HLA-A_2
1991	Yokohama (Japonia)	XI	— tehnici bazate pe PCR — antropologie, transplantare — reglarea genelor HLA

GENETICĂ

Genele sistemului HLA nu constituie decât o parte dintr-un ansamblu genetic mai important numit *Complex Major de Histocompatibilitate* (CMH) situat pe brațul scurt al cromosomului 6 (C6) și care joacă un rol determinant în răspunsul imun. El reprezintă 1/1 000 din genomul uman.

CMH comportă mai multe locusuri (fig. XVI.1) care controlează expresia unor markeri enzimatici, markeri de grupe sanguine eritrocitare, componente ale complementului, receptori de membrană a limfocitelor B, antigenele HLA etc. (20) (fig. XVI.1).

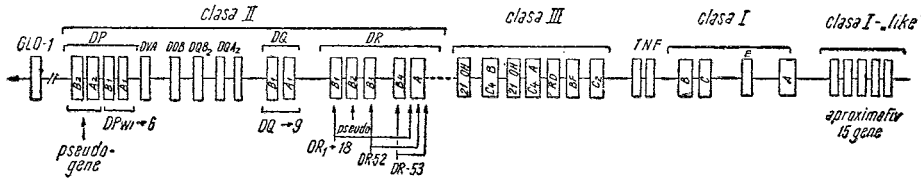


Fig. XVI.1. — Reprezentare schematică a braţului scurt al cromosomului 6.

SISTEME GENETICE DIFERITE DE SISTEMUL HLA LOCALIZATE PE CROMOSOMUL 6

a) *Locusuri ce controlează markeri enzimatici:*

— fosfoglucomutaza eritrocitară (PGM3): între locusul PGM3 şi sisemul HLA există posibilitatea unor recombinări genetice a căror frecvenţă variază cu sexul. Asocierea celor două sisteme este de fapt mult mai slabă la femei decât la bărbaţi. La aceştia din urmă, locusul PGM3 este situat la distanţă egală 17 CM (centi-Morgani) de centromer şi de sistemul HLA;

— pepsinogenul urinar (P5): locusul P5 este la o distanţă de 20 CM de complexul HLA, de partea locusului A. Comportă două alele;

— glioxalaza 1 eritrocitară (GLO_1): locusul GLO este situat între locusul PGM_3 şi complexul HLA, la o distanţă de 10 CM de ultimul. Comportă două alele. Nu există diferenţe de frecvenţă a recombinărilor GLO_1-HLA după sex;

— indolfenoloxidaza tetramerică şi enzima malică sunt situate pe braţul lung al cromosomului 6.

b) *Locusuri ce controlează markeri de grup sanguin* (sistemul P): nu se cunoaşte cu precizie poziţia lor pe C6, dacă sunt situate pe braţul lung sau scurt. Se pare că sistemul P se găseşte mai aproape de locusul PGM_3 decât de HLA.

Sistemele Chido (Ch) şi Rodgers (Rg): există o legătură puternică între locusul Ch şi sistemul HLA, gena pentru sistemul Chido fiind cartată pe C6 între locusurile HLA-D şi HLA-B. Antigenul Chido este decelabil pe eritrocite şi în plasma a 98% dintre subiecţii care devin astfel Ch (a+), restul de 2% fiind Ch (a—). Gena pentru sistemul Rodgers este situată între locusurile HLA-D şi A. Antigenul Rg este prezent pe eritrocite şi în plasma a 97% subiecţi Rg(a+), iar restul de 3% fiind Rg(a—).

Fenotipul rar Ch (a—) Rg (a—) nu se găseşte decât la bolnavii care prezintă un deficit total al fracţiunii C_4 a complementului.

c) *Locusuri ce controlează fracţiuni ale complementului.* Rolul important al regiunii HLA ca regiune cromosomală cu semnificaţie imunologică a crescut odată cu descoperirea legăturii dintre sistemul HLA şi genele care controlează fracţiuni de complement (C_2, C_4 şi factorul BF).

Produsele lor sunt de fapt considerate ca antigene de histocompatibilitate de clasa a III-a, alături de antigenele HLA-ABC care sunt antigene de clasa I și antigenele HLA-DR, DQ, DP care sunt antigene de clasa a II-a.

Faptul că factorii C_2, C_4 și BF ai cascadei complementului sunt cartați în regiunea HLA este deosebit de important, deoarece ei produc activarea fracțiunii C_3 a complementului, care este componenta centrală a cascadei complementului; de aceea ei joacă un rol vital în faza efectoare a răspunsului imun.

d) *Locusuri ce controlează receptorii de membrană ai limfocitelor B.* Aceste locusuri controlează receptorii specifici ai fracțiunilor C_3b și C_3D ale complementului.

e) *Gene de metabolism,* ca enzime neimplicate în funcții imunitare:

— hidroxilază (21-OH);

— gena care controlează metabolismul fierului și al cărei deficit provoacă hemocromatoză.

f) *Gene alfa și beta* care codifică pentru TNF între HLA-B și genele de complement.

g) *Gena factorului XIII al coagulării,* care este polimorfă (cu 14 markeri), situată în partea telomerică a cromosomului 6.

SISTEMUL MAJOR DE HISTOCOMPATIBILITATE LA OM

Sistemul HLA este constituit dintr-un ansamblu de cel puțin șase locusuri situate pe brațul scurt al cromosomului 6, de la periferie spre centromer (fig. XVI.2).

Fiecare locus este definit printr-o genă care aparține unei serii alelice bine determinate. Se disting trei clase:

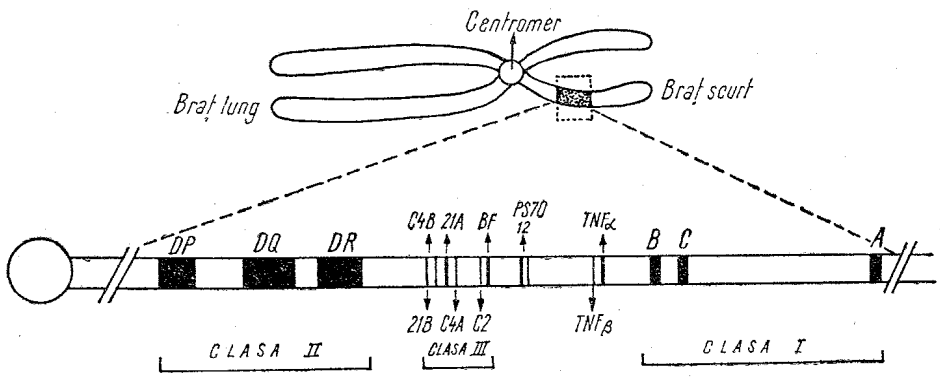


Fig. XVI.2. — Localizarea complexului HLA pe cromosomul 6 și componența sa (schemă).

Moleculele de clasa I cu locusurile A, B, C; molecule de clasa a II-a cu locusurile (subregiunile) DP, DQ și DR; molecule de clasa a III-a cu locusurile pentru componentele C2, C4A și C4B și pentru componentele B properdinice ale sistemului complementului; 21A și 21B = locusurile pentru hidroxilaza A și B; TNFα și TNFβ = locusurile pentru factorii de necroză tumorală α și β; PS70 = locusurile pentru proteina de stres 70.

Clasa I cuprinde locusurile HLA-A, HLA-B și HLA-C care codifică pentru determinanți antigenici prezenți pe totalitatea celulelor nucleate din organism.

Clasa a II-a cuprinde locusurile HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP strâns legate între ele, ale căror produși sunt exprimați doar pe unele categorii de celule, ca limfocite B, monocite, macrofage, celule Langerhans (toate celule prezentatoare de antigen), celule T activate, celule endoteliale etc.

Regiunea HLA-D este cea mai complexă din tot sistemul HLA. Prima serie alelică a acestei regiuni a fost seria HLA-Dw definită printr-o reacție mixtă limfocitară. Ulterior au fost identificate seriile HLA-DR, strâns legată de cea precedentă, de unde și numele DR (D *related*), HLA-DQ, iar recent seria HLA-DP, definită printr-o cultură mixtă limfocitară secundară.

Clasa a III-a cuprinde locusurile fracțiunilor de complement C_2, C_{4a}, C_{4b}, factor BF situate între locusul HLA-D și B strâns legate de sistemul HLA.

Clasic produșii genelor HLA-A, B și C sunt studiați prin metode serologice și de aceea aceste antigene se numesc SD *(serologically defined)*. Produșii genelor HLA-D și DP sunt studiați prin tehnica culturii mixte limfocitare primare și respectiv secundare și de aceea se numesc antigene LD *(lymphocyte defined)*. Produșii genelor HLA-DR și DQ sunt testați prin metode serologice, dar asemănările lor structurale și funcționale cu alte antigene HLA-D împiedică asimilarea lor cu antigenele SD.

ALTE GENE LOCALIZATE PE CROMOSOMUL 6

În regiunea CMH se găsesc numeroase gene asemănătoare cu cele de clasa I, unele situate între HLA-A și C (denumite HLA-E), altele mai telomerice lui HLA-A (între HLA-A și extremitatea cromosomului).

Unii autori le denumesc gene de clasa a IV-a, ceea ce dă loc la confuzii cu enzimele cartate în această regiune și care, de asemenea, sunt denumite de „clasa a IV-a". Deocamdată se preferă denumirea de molecule de clasa I-*like* (17, 18, 64).

Ele au o greutate moleculară în jur de 45 000 d, se asociază cu B_2-microglobulina și diferă de moleculele de clasa I prin polimorfismul lor mai redus, ca și printr-o distribuție tisulară restrânsă.

Multe din aceste molecule sunt similare cu cele descrise la șoarece, printre care și moleculele care ar induce o toleranță la grefa de piele, cu aplicații promițătoare în domeniul transplantării.

PROPRIETĂȚILE GENELOR SISTEMULUI HLA ȘI DESCRIEREA LOCUSURILOR

Toate genele HLA au trei proprietăți esențiale:
— polimorfismul;
— codominanța;

— transmiterea în bloc a unei combinații de alele de la părinți la copii.

Polimorfismul se datorează numărului mare de alele (polialelism) pentru fiecare din genele HLA. Fiecărui locus îi corespunde un ansamblu de alele operațional separate, mutual exclusive, cu expresie codominantă. Această diversitate generează un număr mare de combinații (haplotipuri). Cum există doi cromosomi 6, numărul de combinații genotipice depășește 10^{12}. Această mare diversitate explică de ce este greu să se găsească două persoane neînrudite, HLA identice.

Sistemul HLA este sistemul genetic cel mai complex și polimorf din organism. Studiul acestui polimorfism se bazează pe tehnici de izoelectrofocalizare care permit numărarea alelelor fiecărui locus.

Codominanța semnifică faptul că fiecare alelă de pe fiecare cromosom are o expresie pe membrana celulară și că produșii pot fi decelați utilizând o tehnică adecvată.

Deoarece toate persoanele au câte 2 cromosomi 6, există maximum 2 alele pentru fiecare serie HLA-A,B,C, DR, DQ, DP (câte o singură alelă pentru fiecare locus de pe fiecare cromosom) care au produși genetici pe suprafața celulei (practic sunt exprimate atât alele materne cât și cele paterne). Dacă pentru un locus, cele două alele parentale sunt identice subiectul este homozigot. Tehnica de limfocitotoxicitate nefiind cantitativă, nu poate decela decât un singur antigen corespunzător acestui locus.

Dacă o persoană este heterozigotă pentru un locus, produșii celor două alele ale acestui locus vor fi prezenți pe suprafața celulei. Totuși această codominanță nu este totdeauna adevărată, așa cum se întâmplă pentru unele gene de clasa a II-a unde există alele nule sau silențioase.

Transmiterea în bloc a unei combinații de alele de la părinți la copii reprezintă a treia proprietate esențială a genelor HLA. Este consecința legăturilor fizice foarte strânse care există între genele de pe cromosomul 6, fiecare cromosom fiind *transmis în bloc* de la părinți la copii, ca haplotip.

Locusul HLA-A cuprinde 28 de specificități din care antigenul HLA-A_2 este prezent la aproape jumătate din populație și, în plus, este cel mai antigenic dintre toate.

Pe măsură ce se descoperă seruri noi, vechile specificități sunt scindate în specificități mai înguste, care accentuează și mai mult polimorfismul și așa foarte mare al acestui sistem genetic.

De exemplu: antigenul HLA-A_9 a fost scindat în două subspecificități — A_{23} și A_{24}; la fel HLA-A_{10} în A_{25} și A_{26}. Un număr de 5 antigene — A_{29}, A_{30}, A_{31}, A_{32}, A_{33} — care făceau parte din așa-numitul antigen HLA-A_{19}, au devenit antigene de sine stătătoare.

Locusul HLA-B este cel mai bogat reprezentat, cuprinzând peste 59 de antigene, din care multe provin prin scindare, ca: HLA-B_5, B_{12}, B^{15}_{16}, B^{15}_{16} etc. (tabelul 16.II, în care în paranteză sunt trecute antigenele scindate).

Antigenele Bw4 și Bw6 au specificitate mai largă și de aceea se numesc „antigene publice".

Specificitatea HLA-Bw4 recunoaşte antigenele HLA-B_5, B_{13}, B_{17}, B_{27}, B_{37}, B_{38}, B_{44}, B_{49}, B_{53}, B_{59}, B_{63}, B_{77}; celelalte antigene HLA-B aparţin antigenului HLA-Bw6. Această apartenenţă, diferită la cele două antigene publice mai ales pentru antigenele scindate, a ajutat mult la stabilirea fenotipului HLA în testarea în laborator.

TABELUL 16.II

Lista antigenelor HLA recunoscute la a XI-a Conferinţă *(Workshop)* **în domeniul HLA — Yokohama, 1991**

A	B	B	C	D	DR	DQ	DP
A1	B5	B47	Cw1	Dw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B7	B48	Cw2	Dw2	DRBr	DQ2	DPw2
A203	B703	B49(21)	Cw3	Dw3	DR2	DQ3	DPw3
A210	B8	B50(21)	Cw4	Dw4	DR3	DQ4	DPw4
A3	B12	B51(5)	Cw5	Dw5	DR4	DQ5(1)	DPw5
A9	B13	B5102	Cw6	Dw6	DR5	DQ6(1)	DPw6
A10	B14	B5103	Cw7	Dw7	DR6	DQ7(3)	
A11	B15	B52(5)	Cw8	Dw8	DR7	DQ8(3)	
A19	B16	B53	Cw9(w3)	Dw9	DR8	DQ9(3)	
A23(9)	B17	B54(22)	Cw10(w3)	Dw10	DR9		
A24(9)	B18	B55(22)		Dw11(w7)	DR10		
A2403	B21	B56(22)		Dw12	DR11(5)		
A25(10)	B22	B57(17)		Dw13	DR12(5)		
A26(10)	B27	B58(17)		Dw14	DR13(6)		
A28	B35	B59		Dw15	DR14(6)		
A29(19)	B37	B60(40)		Dw16	DR1403		
A30(19)	B38(16)	B61(40)		Dw17(w7)	DR1404		
A31(19)	B39(16)	B62(15)		Dw18(w6)	DR15(2)		
A32(19)	B3901	B63(15)		Dw19(w6)	DR16(2)		
A33(19)	B3902	B64(14)		Dw20	DR17(3)		
A34(10)	B40	B65(14)		Dw21	DR18(3)		
A36	B4005	B67		Dw22			
A43	B41	B70		Dw23	DR51		
A66(10)	B42	B71(70)					
A68(28)	B44(12)	B72(70)		Dw24	DR52		
A69(28)	B45(12)	B73		Dw25			
A74(19)	B46	B75(15)		Dw26	DR53		
		B76(15)					
		B77(15)					
		B7801					
		Bw4					
		Bw6					

Locusul C cuprinde 10 specificităţi, corespunzând la 10 alele.

Locusul D cuprinde 26 specificităţi Dw, corespunzând la 26 alele.

Locusul DR cuprinde 9 specificităţi corespunzând la 20 alele.

Locusul DQ cuprinde 9 specificităţi corespunzând la 9 alele.

Locusul DP cuprinde 6 specificităţi, corespunzând la 6 alele.

Genele locusurilor HLA-A, -B şi -C codifică moleculele de clasa I, iar genele locusurilor HLA-DR, -DQ şi -DP codifică moleculele de clasa a II-a.

Transmiterea genetică a antigenelor HLA. Toți subiecții posedă **pe** fiecare cromosom câte un antigen pentru fiecare locus. Transmiterea antigenelor se face în bloc, sub formă de haplotip. Deoarece fiecare părinte posedă 2 cromosomi 6 și nu transmite decât unul, nu există decât patru combinații posibile pentru copiii dintr-o familie; așadar, doar patru feluri de copii pot fi creați din punctul de vedere al transmiterii antigenelor HLA (fig. XVI.3).

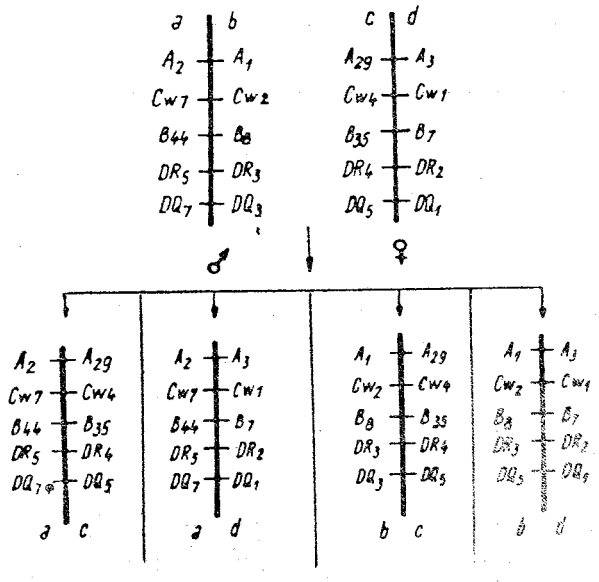


Fig. XVI.3. — Model de transmitere a antigenelor HLA într-o familie.

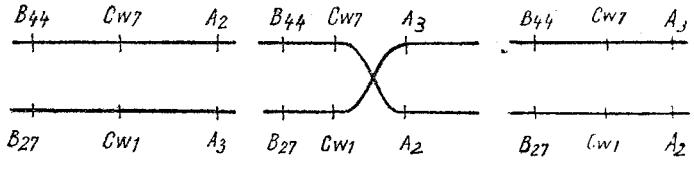


Fig. XVI.4. — Model de recombinare între antigenele HLA (locus A și B).

Definiții. Se numește *fenotip HLA* totalitatea antigenelor determinate la un individ. De exemplu: HLA-A_1 A_2 B_8 B_{51} C_{w7} DR_2 DR_3 DQ_1 DQ_3.

Se numește *haplotip* ansamblul de gene HLA purtate de un același cromosom și transmise în bloc de un părinte.

Se numește *genotip* dispoziția alelelor pe cei doi cromosomi parentali; genotipul este alcătuit de fapt din două haplotipuri.

De exemplu: A_1 B_8 C_{w1} DQ_3/A_2 B_{51} C_{w7} DR_2 DQ_1.

Ele se deduc prin studierea mai multor persoane dintr-o familie.

Genele și haplotipurile HLA se transmit de la părinți la copii după modelul mendelian clasic, astfel încât copiii vor fi întotdeauna semiidentici cu părinții lor. Copiii pot avea între ei trei tipuri de relații genetice: 25% să fie HLA identici; 50% să fie semiidentici și 25% să fie diferiți. Într-un număr mic de cazuri (aproximativ 1%) antigenele nu sunt recunoscute, fie datorită unui caracter imunogen mai puțin marcat, fie din lipsa vremelnică a serurilor reactivi care să permită identificarea. Ele se numesc *„blanks"* sau „gene albe".

În tabelul 16.II sunt trecute antigenele HLA după denumirea internațională stabilită în 1991 la al XI-lea *Workshop* de la Yokohama.

Antigenele HLA-A și HLA-B nu sunt numerotate consecutiv, așa cum sunt numerotate celelalte antigene HLA, deoarece multe din specificitățile A și B au fost stabilite înainte de descoperirea locusului respectiv și pentru a se evita renumerotarea s-au păstrat numerele existente.

Nu există nici un antigen A și B notat cu cifrele 4 și 6, deoarece ele au fost rezervate unor sisteme de antigene leucocitare cu specificitate largă, intens studiate în momentul stabilirii nomenclaturii (B_{w4} și B_{w6}).

Genele și moleculele (antigenele) de clasa I. Genele de clasa I sunt situate pe 3 locusuri — A, B și C (HLA-A, HLA-B, HLA-C) și codează moleculele de antigene de clasa I, care sunt moleculele clasice de histocompatibilitate de grefă.

Expresia lor este aproape ubicuitară în țesuturi, fiind găsite pe toate celulele nucleate și pe plachete, excepție făcând endoteliul cornean, pancreasul exocrin, celulele acinare ale parotidei, neuronii din sistemul nervos central. Sunt, de asemenea, decelate pe eritrocitele tinere, probabil prin conservare de pe precursorii nucleați. Celulele sistemului imun exprimă niveluri înalte de antigene de clasa I. Plasma conține, de asemenea, cantități variate de antigene solubile. Conținutul de antigene HLA al diferitelor țesuturi este variabil. Cea mai bogată este splina, urmată de plămân, ficat, rinichi, intestin, cord, aortă, creier. Celulele trofoblastice sunt lipsite de antigene HLA sau ele sunt mascate de o substanță — glicocalix, ceea ce ar putea explica cel puțin în parte supraviețuirea fetusului ca alografă, deoarece nu stimulează nici un fel de răspuns imun în țesuturile materne.

Distribuția aproape ubicuitară a antigenelor de clasa I corespunde rolului lor fiziologic, acela de a prezenta peptidele antigenice străine, cum sunt de exemplu cele virale, limfocitelor citotoxice (limfocite TCD8+), a căror acțiune distrugătoare este limitată numai pentru celulele care poartă același peptid antigenic și aceeași moleculă de clasa I (fenomen de restricție). În cazul unui transplant de organ, antigenele de clasa I din acesta sunt principalele antigene recunoscute de limfocitele citotoxice ale primitorului în cursul respingerii transplantului.

Structură. Antigenele de clasa I a CMH au în structura lor două lanțuri de aminoacizi: un lanț greu alfa și un lanț ușor beta. Lanțul greu care ancorează întreaga moleculă de clasa I în membrana celulară, are o greutate moleculară (GM) de aproximativ 44 000 d (daltoni) și este o moleculă

glicoproteică cu trei regiuni bine definite: extramembranară, transmembranară și intracitoplasmatică (54).

Partea extramembranară este compusă din trei domenii: α_1, α_2 și α_3. Domeniile α_1 și α_2 dau polimorfismul moleculei adică stabilesc specificitatea HLA la suprafața celulei, iar domeniul α_3 este asociat noncovalent cu lanțul ușor, cu GM de aproximativ 12 000 d, care este β_2-microglobu-

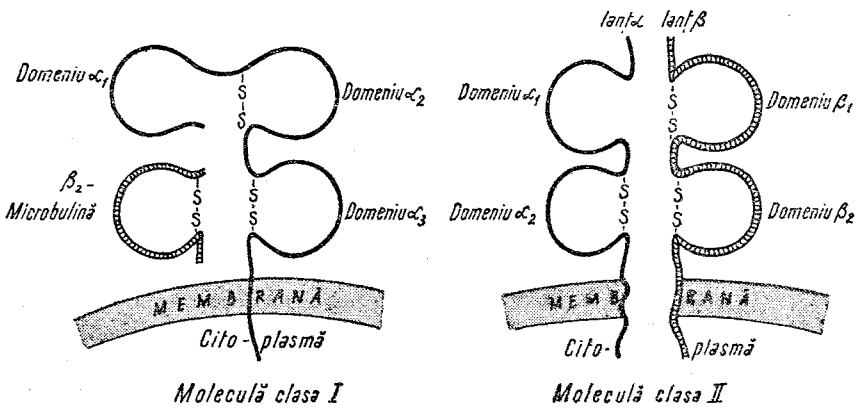


Fig. XVI.5. — Structura antigenelor HLA de clasa I și a II-a (schemă).

lina, a cărei sinteză este codificată de o genă (cu 4 axoni) situată pe cromosomul 15. Aceasta este în întregime extracelulară. Deși au fost descrise două variante, a fost identificată o singură alelă. Este un polipeptid conținând 99 AA. Secvența de AA este cunoscută și ca domeniul α_3 al lanțului greu α și are omologie cu imunoglobulinele. Defectele genetice de exprimare a acestei microglobuline se însoțesc de o lipsă a exprimării specificităților HLA de clasa I. Unele celule tumorale sunt lipsite de antigene HLA datorită fie unei lipse de exprimare a beta-2-microglobulinei, fie lipsei de exprimare a ambelor lanțuri. Linia celulară DAUDI, prin lipsa beta-2-microglobulinei, nu exprimă antigenele HLA de clasa I pe suprafața celulei.

Beta-2-microglobulina se întâlnește în numeroase lichide biologice (ser, urină) și poate servi ca marker al unei proliferări tumorale sau a unei alterări a funcției renale.

Structura antigenelor de clasa I este similară cu a altor proteine de clasa I de la alte specii de mamifere (de exmplu: moleculele H-2K și 2D de la șoarece); între moleculele de beta-2-microglobulină ale tuturor speciilor există o asemănare foarte mare.

Structura terțiară a moleculelor de clasa I a fost vizualizată grație cristalografiei prin raze X. Cristalirea moleculei de HLA-A_2 a permis stabilirea structurii tridimensionale a moleculei, interacțiunile între domeniile α_1, α_2, α_3 și β_2-microglobulina, permițând reprezentarea ei spațială așa cum este exprimată la suprafața celulei.

Între domeniile α_1 și α_2 se găsește o cavitate ale cărei buze sunt formate de elicele α_1 și α_2, iar fundul este format de lanțurile β (vezi tabe-

lul 16.VIII) care realizează un platou pe fundul cavității. Platoul este susținut de α_3 care se leagă de membrana celulară printr-o secvență scurtă de AA.

Această cavitate este un sit (loc) de recunoaștere *(antigen binding pocket)* și orice schimbare a elicelor sau a fundului duc la modificarea capacității de captare a unui peptid. În această cavitate se plasează peptidul care va fi prezentat limfocitului T.

Cunoașterea structurii tridimensionale a moleculei HLA-A_2 a permis o înțelegere mai bună a zonelor variabile și conservate, în legătură cu interacțiunea între molecule de clasa I, peptidele antigenice și receptorul pentru limfocite T (68).

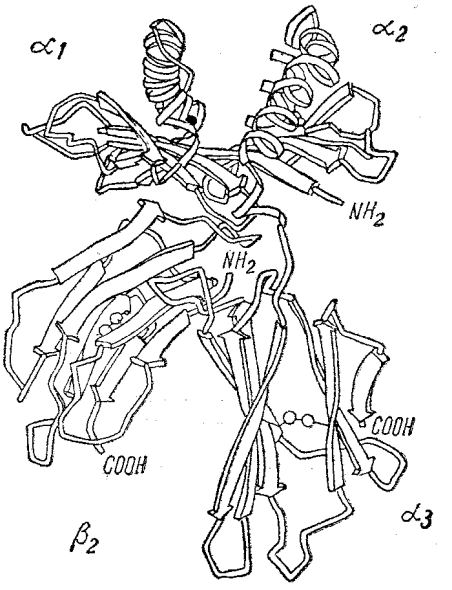


Fig. XVI.6. — Reprezentare schematică a structurii cristalografice tridimensionale a moleculei HLA-A2. Vedere laterală (68).

Determinarea serologică a antigenelor HLA-A, -B, -C, se face printr-o reacție de limfocitotoxicitate care constă în a număra procentajul de limfocite omorîte în prezența unui anticorp specific și a complementului de iepure, *in vitro*. Sursele de seruri HLA reactivi sunt seruri de la gravide, persoane politransfuzate sau persoane care au respins o grefă, seruri de la voluntari imunizați în sistemul HLA și mai nou — anticorpi monoclonali (70).

Studiul biochimic al antigenelor de clasa I s-a făcut prin analiza punctului izoelectric al proteinelor (izoelectro-focalizare sau electroforeză într-o dimensiune) care a permis determinarea de subdiviziuni antigenice nedecelabile în serologie, de exemplu: pentru antigenul HLA-B_{27} s-au descris șapte subtipuri, putându-se vorbi astăzi de o tipare biochimică alături de tiparea serologică (reacție de citotoxicitate). Serologia definește 24 antigene HLA-A, 50 antigene HLA-B și 11 antigene HLA-C față de biochimie care găsește 34, 59 și respectiv 11 subtipuri de molecule.

Genele HLA-A, -B, -C definite prin biologie moleculară. Studiile de biologie moleculară au permis să se opereze în genomul celular, evidențiind ordinea și numărul de gene, structura și chiar secvența nucleotidelor acestor gene, polimorfismul genelor alelice (RFLP), funcția și reglarea acestor gene (8, 51).

Structura clasică a genelor HLA de clasa I are 8 exoni și poartă introni pe toată lungimea lor și pe codonul terminal (fig. XVI.7). Exonul 1 este secvența semnal, exonii 2, 3, 4 corespund domeniilor alfa$_1$, alfa$_2$, alfa$_3$, ceilalți exoni codifică părțile transmembranară și intracitoplasmatică.

Utilizând tehnica de Southern Blot s-a descris un polimorfism de

mărime a fragmentelor de restricție (*Restriction Fragment Lenght Polymorphism* sau RFLP), permițând tipizarea prin biologie moleculară.

Polimorfismul este mai mare decât cel observat prin serologia clasică. Subiecții A_9 par să aibă mai puține gene de clasa I decât normal, în timp ce subiecții A_{29} au un număr mai mare.

Numărul de gene care codifică antigenele HLA-A, B și C este mare (peste 20 pentru A, peste 30 pentru B și peste 10 pentru C), la care se adaugă și pseudogene, care codifică pentru proteine solubile, echivalente a QaT_1 de la șoarece.

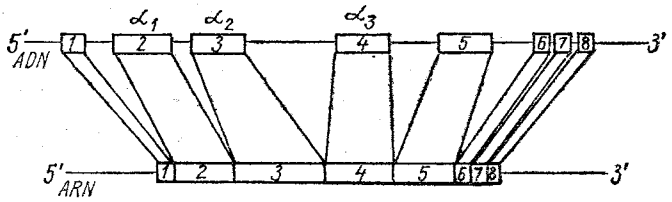


Fig. XVI.7. — Structura unei gene α de clasa I:
— exonii 2, 3, 4 codifică domeniile α_1, α_2, α_3 (regiunea extracelulară);
— exonul 5 codifică regiunea transmembranară;
— exonii 6, 7, 8 codifică regiunea intracelulară.

Genele de clasa I sunt asemănătoare între ele, diferențele fiind mici. Produșii seriei A par mai asemănători între ei decât produșii B sau C între ei.

Genele și moleculele (antigenele) de clasa a II-a aparțin regiunii HLA-D a CMH din care trei regiuni sunt foarte bine definite: HLA-DR (care reprezintă prototipul moleculelor de clasa a II-a), HLA-DQ și HLA-DP.

Studii recente au identificat în regiunea HLA-D a CMH, pe lângă cele trei locusuri (DR, DQ și DP), noi gene a căror cunoaștere a conferit un aspect mai complex acestei regiuni (fig. XVI.8). Printre acestea sunt de menționat:

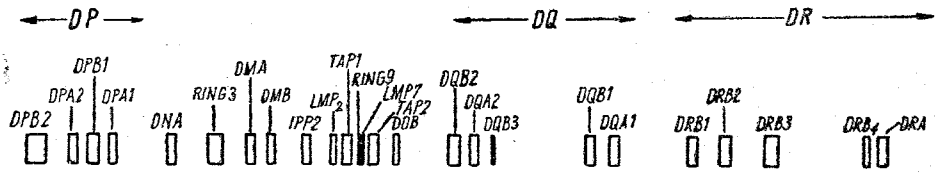


Fig. XVI.8. — Aspectul complex și componentele regiunii HLA-D (30a).

— HLA-DNA și HLA-DGB care se pot asocia pentru a forma un heterodimer α/β;

— HLA-DMA și HLA-DMB descoperite prin studii cristalografice, cu funcție încă neprecizată;

— TAP1, TAP2, LMP2 și LMP7 alcătuiesc o grupare de gene strâns legate. Aceste gene implicate în prezentarea peptidelor antigenice cu molecule de clasa I sunt însă cartate în această regiune HLA-D.

Există unele dovezi că și alți factori implicați în prezentarea antigenului cu molecule de clasa a II-a sunt localizați în intervalul dintre IMB și DQB1 (30 a).

Produșii genelor de clasa a II-a au fost definiți prima dată prin funcția lor, care este de a stimula proliferarea limfocitară într-o cultură mixtă celulară. Reacția constă în a evalua proliferarea celulară când sunt cultivate împreună limfocite de la două persoane. Împiedicând proliferarea uneia dintre populații prin tratare cu mitomicină C sau iradiere cu raze X fără a fi omorâtă, ea joacă un rol de „stimulant", în timp ce cealaltă este partea „care răspunde".

Prin studii familiale (în special familii unde există recombinări) s-a demonstrat că această reacție este guvernată de regiunea HLA-D.

Tiparea HLA-D (adică determinarea specificităților HLA-D_w, se face utilizând celule homozigote (*Homozygous Typing Cells* sau HTC). Când celulele homozigote sunt utilizate ca celule stimulante reactiv, ele nu indică nici un răspuns la celulele de testat dacă cele două populații poartă pe suprafața celulei aceleași antigene HLA-D. Astfel s-au definit antigenele HLA-D_{w1}, D_{w2}, D_{w3} etc. Studiul serologic pe limfocite B izolate a dus la descoperirea seriei HLA-DR (D *related*), asemănătoare dar nu identică cu seria D_w, seriile HLA-DR_{w52} și 53 — care segregă în familie ca alele și la seria DQ.

Moleculele de clasa a II-a, spre deosebire de clasa I, au o distribuție tisulară restrânsă, fiind prezente predominant pe celulele imunocompetente: limfocite B, macrofage și derivatele lor, cum sunt monocitele, celulele Langerhans ale pielii, celulele Kupffer ale ficatului, pe celule endoteliale, spermatozoizi, limfocite T activate (dar nu pe limfocite T în stare de repaus), pe unele celule în condiții patologice, ca de exemplu celulele epiteliale tiroidiene în boala Basedow și tiroidita Hashimoto sau celulele insulare în diabetul de tip I.

Monocitele au o expresie disociată a moleculelor de clasa a II-a (18):

10% din ele au atât molecule DR cât și DQ;

90% din ele au doar molecule DR și *nu* DQ.

La fel, limfoblaștii din leucemiile non T sunt de trei tipuri, în funcție de moleculele de clasa a II-a purtate pe suprafața lor:

DR+DP+DQ+
DR+DP+DQ—
DR+DP—DQ—

ceea ce indică și ordinea de expresie a acestor molecule: întâi DR, apoi DP, apoi DQ.

Celulele sușe mieloide exprimă în principal molecule DR și slab DQ.

Ca și în cazul moleculelor de clasa I, anumite substanțe (de exemplu gama-interferon) pot induce și expresia moleculelor de clasa a II-a pe suprafața celulelor (Degos).

În deficite imunitare, cum este sindromul Bare, există un defect genetic de exprimare atât a moleculelor de clasa I cât și de clasa a II-a (Degos).

Structură. Moleculele de clasa a II-a sunt formate din două lanțuri polipeptidice: un lanț greu alfa cu GM=33 000 d și un lanț ușor beta

cu GM=29 000 d (fig. XVI. 9). Cele două lanțuri sunt ancorate în membrana celulară. Ele cuprind:

— o regiune extramembranară (sau extracelulară) mai mare, cu NH_2 terminal: regiunea α_1 și α_2 și β_1 și β_2;

— o regiune transmembranară, bogată în aa, hidrofobă, permite ancorarea moleculei de membrana celulei.

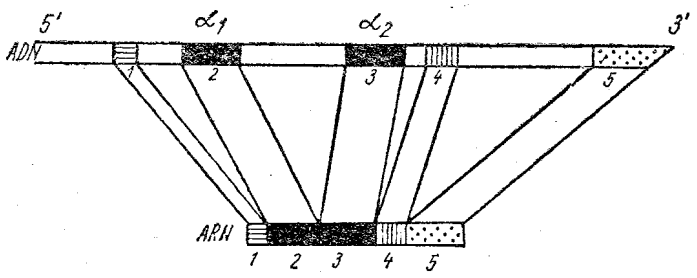


Fig. XVI.9. — Structura unei gene α de clasa a II-a:
— exonii 2 și 3 codifică regiunea transmembranară, domeniile α_1 și α_2;
— exonul 4 codifică regiunile transmembranară și citoplasmatică.

Ambele lanțuri sunt codificate de CMH, dar spre deosebire de antigenele de clasa I, de aceeași regiune de pe cromosomul 6 și sunt asociate în timpul traiectului intracelular cu un lanț invariabil I i cu GM=31 000 d, necodificat de CMH, ci de cromosomul 5.

Domeniul α_1 este mai puțin scurt, conține 85—88 AA față de β_1 care este mai lung, conține 95 AA și are o punte di. S între pozițiile 15 și 79.

Domeniile α_2 și β_2 au o talie identică: 95 AA; ele comportă o punte di.S intracatanară.

În cazul moleculelor DR, lanțul alfa este constant, monomorf în toate alele, așa cum o demonstrează electroforeza în gel bidimensional, ca și cromatografia schimbătoare de ioni.

Lanțul beta este polimorf. Variațiile structurale sunt mai mari în domeniul NH_2 terminal — lanțul B_1, decât în domeniul B_2. El poartă determinanții DR.

Serologic, moleculele DR și DQ sunt determinate prin tehnica de limfocitotoxicitate pe limfocite B izolate.

Dintre metodele de îmbogățire a suspensiilor limfocitare B din sângele periferic se pot cita:

— formarea rozetelor cu hematii de oaie sau berbec, bazată pe proprietatea limfocitelor T de a se fixa specific pe hematiile de berbec prin receptorul E de suprafață. Rozetele astfel formate sunt separate de celelalte limfocite printr-o centrifugare în gradient de densitate. Celulele rămase în suspensie sunt limfo B, monocite;

— formarea rozetelor cu hematii de bou, cuplate cu un anticorp monoclonal anti-HLA clasa a II-a;

— separare pe fibre de nylon, utilizând proprietatea limfocitelor B de a adera de fibrele de nylon fără alterare celulară;

— separare imunomagnetică cu bile de fier învelite cu un anticorp monoclonal de clasa a II-a. Limfocitele formează rozete cu bilele care sunt separate cu un magnet.

Ca masă de molecule de clasa a II-a mai sunt folosite:

— linii limfoblastoide B;

— limfocite de la bolnavi cu leucemie limfatică cronică;

— limfocite din splină sau ganglioni limfatici;

— limfocite T activate.

Studiile serologice se pot face și fără separare de limfocite T și B prin dublu marcaj în imunofluorescență.

Studiile biochimice grație tehnicii de electroforeză în gel cu două dimensiuni (greutatea moleculară și încărcătura electrică) au permis izolarea lanțurilor alfa și beta a moleculelor de clasa a II-a, arătând că, în molecula DR, lanțul alfa este monomorf (identic la toți indivizii), în timp ce lanțul beta este polimorf și poartă determinanții DR (51). Unii indivizi pot avea 3 lanțuri beta (subgrupe de DR_2).

În moleculele DQ (denumiri vechi DC, sau DS sau MB), ambele lanțuri, alfa și beta sunt polimorfe.

La suprafața celulei pot apărea molecule hibride alcătuite din combinații de lanțuri alfa și beta (provenind de la 2 cromosomi) ai aceleiași serii (de obicei DQ) sau chiar combinația unui lanț alfa la unei serii cu lanțul beta al altei serii. Moleculele hibride pot avea determinanți antigenici noi corespunzând punctelor de legătură.

Tehnicile de imunologie celulară, ca reacția mixtă limfocitară și HTC au evidențiat seria D_w, iar cultura mixtă secundară a pus în evidență seria HLA-DP.

Moleculele DP sunt alcătuite din două lanțuri alfa și beta, ambele polimorfe. Ele sunt în general definite celular, mai puțin biochimic și nu există anticorpi pentru definirea lor serologică.

Studiile de biologie moleculară au permis evidențierea genelor din regiunea HLA-D și structura lor (fig. XVI.9 și fig. XVI.10).

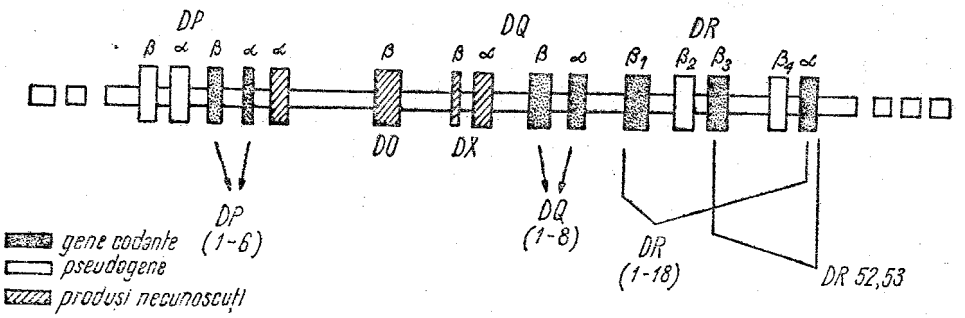


Fig. XVI.10. — Genele din regiunea HLA-D (39).

Regiunea HLA-DR include o genă alfa și 3 gene beta (I, III, IV).

Regiunea HLA-DQ este subdivizată în: regiunea HLA-DQ alfa și beta și HLA-DX alfa și beta.

Regiunea HLA-DP include 2 gene alfa și 2 gene beta.

Moleculele DR beta sunt polimorfe. Combinația lor cu o aceeași genă alfa dă naștere la mai multe tipuri de molecule. Produsul genelor alfa cu

beta$_1$ corespunde moleculelor HLA-DR. Produsul genelor alfa cu beta III corespunde moleculelor HLA-DR$_{52}$. Produsul genelor alfa cu beta IV corespunde moleculelor HLA-DR$_{53}$. Toți indivizii exprimă pe suprafața celulelor molecule HLA-DR și doar unii dintre el exprimă moleculele HLA-DR$_{52}$ sau DR$_{53}$. Aceasta înseamnă că genele B III și B IV sunt pentru unii indivizi gene reale, iar pentru alții pseudogene.

Deoarece DR$_{52}$ și DR$_{53}$ apar ca alele, fiind exprimate pe același haplotip sau pe altul sau nici pe unul nici pe altul, înseamnă că trebuie să existe o reglare cu totul particulară a exprimării lor pe suprafața celulei.

Prin tehnica de Southern Blot s-a evidențiat un polimorfism marcat al fragmentelor de restricție (11, 50).

Au fost secvențate câteva gene. S-au recunoscut secvențe polimorfe specifice, iar sinteza de oligonucleotide a permis tipizarea care se speră să intre în rutina de laborator.

S-a demonstrat, de asemenea, că există o corelare între definirea serologică, biochimică și în biologie moleculară.

Expresia limitată a antigenelor de clasa a II-a pe câteva tipuri de celule imune (limfocite B, monocite, celule dendritice, limfocite T activate), ca și structura lor asemănătoare cu Ig presupune o serie de funcții biologice ale acestor antigene. Ele ar funcționa ca receptori pentru antigene străine pe care le prezintă limfocitelor T helper (T_h); ele mediază cooperarea celulară între diferite celule imune și controlează producția de anticorpi. Interferonul γ poate induce expresia de antigene de clasa a II-a pe macrofage, ca și pe celule pe care ele nu sunt normal exprimate, ca de exemplu, celule endoteliale, celule tiroidiene, celule epidermice, celule renale.

Cooperarea celulară necesară producției de anticorpi funcționează doar când celulele participante poartă pe ele cel puțin un antigen HLA-D comun (fenomenul de restricție imună (17, 33).

Capacitatea de a reacționa fie puternic, fie slab față de un anumit antigen este controlată genetic și se moștenește după legile mendeliene (56).

Asemenea gene de răspuns imun se găsesc la șoarece (36). Ele au primit numele general de antigene IA (adică asociate cu imunitatea). Studii recente indică antigenele HLA-DQ ca fiind omoloage cu antigenele IA, iar antigenele DR omoloage cu IE din sistemul murin.

Din punct de vedere fiziologic moleculele de clasa a II-a acționează asemănător cu moleculele de clasa I, dar pe alte celule. În general, moleculele de clasa I prezintă peptidele antigenice derivate din degradarea antigenilor intracelulari limfocitelor TC8$^+$ citotoxice, iar moleculele de clasa a II-a prezintă peptidele antigenice ce ajung la celulă pe cale endocitică limfocitelor CD4$^+$ helper. Regiunea HLA-D a CMH joacă un rol esențial în ambele căi ale prezentării antigenului și majoritatea genelor situate în această regiune sunt implicate în recunoașterea imună (30 a).

Dezechilibrul de legare este o particularitate proprie a sistemului HLA și constă în coexistența unor asociații genetice preferențiale între antigenele locusurilor A, B, C, D, DR, DQ, complement, de pe același haplotip.

Astfel, un anumit număr de haplotipuri particulare apar ca o frecvență mai mare decât a alelelor luate izolat și în aceste cazuri se spune că sunt în dezechilibru de legare.

Unele haplotipuri se întâlnesc mai frecvent, ca: A_1 B_8 Cw_7 DR_3; B_{35}-Cw_4 etc. Alte haplotipuri se întâlnesc neașteptat de rar, ca: A_1 B_7, A_2-B_8 etc.

Haplotipul A_1-B_8 ar trebui să se întâlnească cu o frecvență de 0,8%. În realitate, frecvența sa este de 6%. Aceasta nu se poate explica decât făcând apel la selecția biologică care a acționat în decursul timpului.

Haplotipurile astfel selecționate diferă cu populația, regiunea geografică și depind și de procentul de recombinări care pot apărea între antigenele de pe locusuri învecinate. Dezechilibrele de legare în lume sunt diferite. Haplotipurile A_1 B_8 Cw_7 DR_3 A_3 B_7 Cw_7 DR_2 sunt frecvent întâlnite la caucazieni. În Orientul Mijlociu este frecvent haplotipul A_{30} B_{13}, în Africa de Sud A_{33} B_{14}.

Gradul de dezechilibru de legare se poate exprima prin valoarea „delta" care arată relația între frecvența observată a unui haplotip față de frecvența estimată.

Totuși dezechilibrul de legare B_{35}-Cw_4 apare peste tot în lume, indiferent de regiunea geografică. Aceasta se datorește faptului că nivelul de recombinări a fost atât de slab, încât timpul nu a putut să-l șteargă.

Aceste studii interesante pentru antropologie permit a se stabili migrația popoarelor și dinamica populațiilor (52).

Dezechilibrul de legare a fost propus pentru a explica asocierea unor antigene HLA cu diferite boli în care antigenul HLA poate servi ca marker pentru o genă de susceptibilitate la boală, situată în interiorul sau în apropierea locusului sistemului HLA și aflată în dezechilibrul de legare cu acesta.

Variații de frecvență antigenică în diferite populații: antigenul HLA-A_1 este găsit cu frecvență crescută la caucazieni; antigenele HLA-A_{36} și A_{43}, ca și antigenul HLA-B_{w42} au frecvență crescută la negri. Antigenul HLA-A_{w34} apare mai frecvent în Indonezia, HLA-B_{21} la mediteranieni, HLA-B_{22} la australoizi. Invers, antigenul HLA-A_3 este rar la mongoloizi la care se observă cu frecvență crescută antigenul HLA-A_9. Frecvența antigenului HLA-B_{27} variază în diferite populații: sub 1% la negri și japonezi, 9—14% la caucazieni, iar la unii indieni nord-americani frecvența acestui antigen ajunge la 50% (tabelul 16.III).

Reactivitatea serologică încrucișată între antigenele HLA este un fenomen în care un antiser cu o specificitate anumită reacționează și cu un antigen cu altă specificitate. De exemplu: antigenul HLA-A_{28} reacționează adesea cu antigenul HLA-A_2, la fel HLA-A_3 cu HLA-A_{11}. Acest fenomen este explicat parțial prin asemănări structurale între moleculele unor antigene.

Există mai multe tipuri de reacții încrucișate:

— prin anticorpi care recunosc un epitop comun pentru mai multe antigene ale unui același locus, formând familii de antigene denumite CREG *(Cross Reacting Group);*

— prin anticorpi care recunosc determinanți antigenici asemănători, dar nu identici;

— prin anticorpi care recunosc un epitop comun pentru antigene de pe locusuri diferite (de exemplu A_2 și B_{17}).

Serologia definește și noțiuni ca „supertipuri" și „subtipuri" pentru a desemna reactivitatea unor seruri față de antigenele HLA. De exemplu:

TABELUL 16.III

Frecvența antigenelor HLA la caucazieni (după 17) **(clasele I și II)**

HLA-A	%	HLA-B	%	HLA-C	%
A1	26,4	B5	16	Cw1	6,5
A2	49,4	B7	21,7	Cw2	8,0
A3	24,7	B8	18,3	Cw3	23,6
A9	22,3	B12	23,9	Cw4	21,9
A10	11,6	B13	5,7	Cw5	13,3
A11	12,2	B14	7,3	Cw6	16,5
A19	28,7	B15	13,2	Cw7	42,7
A23(A9)	2,8	B16	8,9	Cw8	7,3
A24(A9)	19,5	B17	5,7	Cwx	43,6
A25(A10)	4,7	B18	10,7		
A26(A10)	6,3	B21	5,8		
A28	9,2	B22	5,6		
A29(A19)	5,7	B27	6,7		
A30(A19)	6,9	B35	19,9		
A31(A19)	5,7	B37	3,2		
A32(A19)	7,6	B38(B16)	4,9		
A33(A19)	2,8	B39(B17)	4,0		
A34(A10)	0,2	B40	11,7		
A36	0,2	B41	1,8		
A43	0,0	B42	0,4		
A66(A10)	0,4	B44(B12)	23,1		
Ax	0,8	B45(B12)	0,8		
		B46	0,2		
		B47	0,4		
		B48	0,0		
		B49(B21)	3,6		
		B50(B21)	2,2		
		B51(B5)	12,0		
		B52(B5)	4,0		
		B53	1,0		
		B54(Bw22)	0,2		
		B55(Bw22)	3,2		
		B56(Bw22)	2,2		
		B57(B17)	5,7		
		B58(Bw17)	0,0		
		B59	0,0		
		B60(B40)	7,5		
		B61(B40)	4,2		
		B62(B15)	11,8		
		B63(B15)	1,4		
		B64(B14)	2,2		
		B65(B14)	5,1		
		B67	0,0		
		B70	0,8		
		B71(Bw70)	0,2		
		B72(Bw70)	0,6		
		B73	0,2		
		Bx	0,8		

* In statistica Institutului de hematologie București pe 500 donatori de sânge, frecvența antigenului HLA-B27 este de 9%.

HLA-D	%	HLA-DR	%	HLA-DQ	%
Dw1	24	DR1	18,1	DQ1	54,2
Dw2	12,6	DR2	29,1	DQ2	32,9
Dw3	15,7	DR3	22,6	DQ3	41,2
Dw4	13,0	DR4	23,8		
Dw5	26,7	DR5	27,1		
Dw6	12,9	DR6	21,8		
Dw7	19,1	DR7	22,6		
Dw8	8,6	DR8	5,9		
Dw9	11,1	DR9	1,6		
Dw10	4,4	DR10	1,6		
Dw11(Dw7)	6,3	DR11(DR5)	23,1		
Dw12	2,2	DR12(DR5)	4,0		
Dw13	2,2	DR13(DRw6)	10,0		
Dw14	4,4	DR14(DRw6)	11,3		
Dw15	0,0				
Dw16	0,0				
Dw17(Dw7)	12,8				
Dw18(Dw6)	2,6				
Dw19(Dw6)	10,3				

antigenul HLA-B_{16}. Comparând reacţiile unor seruri anti-B_{16} faţă de celule B_{16}, s-a descoperit că nu toate reacţionează în acelaşi mod: unele recunosc antigenul de pe toate celulele B_{16}, altele reacţionează cu un grup de celule B_{16}, altele cu alt grup de celule B_{16}, demonstrând că există două specificităţi subtipice denumite HLA-B_{38} şi HLA-B_{39} şi una supertipică HLA-B_{16}. La fel şi pentru B_5 (B_{51}, B_{52}, B_{53}), B_{12} (B_{44} şi B_{45}) etc.

Toate celulele care reacţionează contra unui anticorp trebuie să absoarbă acel anticorp.

În tabelul 16.IV sunt trecute principalele grupuri de antigene ce dau reacţii încrucişate.

Genele şi moleculele de clasa a III-a. Descoperirea unei legături între complement (C) şi CMH la numeroase specii şi la om a permis confirmarea rolului fundamental al genelor cartate pe braţul scurt al cromosomului 6 somatic în controlul diferitelor elemente ale răspunsului imun. În prezent este bine stabilit că genele pentru componentele complementului C_2 C_4 (C_4A şi C_4B) şi factorul B al properdinei (BF) sunt asociate cu genele HLA şi sunt situate pe braţul scurt al cromosomului 6 somatic între locusurile HLA-B şi HLA-DR. Gena C_3 este situată pe cromosomul 19 la om şi 17 la şoarece.

Diferitele componente ale complementului suferă o activare în lanţ pe cale clasică sau pe cale alternă, componenta centrală fiind fracţiunea C_3.

Se formează două feluri de complexe enzimatice capabile să cliveze C_3: C_3-convertaza căii clasice prin activarea lui C_4 şi C_2 şi C_3 — convertaza căii alterne prin interacţiunea între C_3 şi factorul BF.

Clivajul lui C_3 permite activarea în continuare a fracţiunilor de com-

TABELUL 16.IV

Principalele grupe de reacții serologice încrucișate (CREG)

Grupa	Specificitățile HLA care dau reacții încrucișate
A_1	A_1 A_{11} A_3 A_{36}
A_2	A_2 A_{28} A_{68} A_{69}
A_9	A_9 A_{23} A_{24}
A_{10}	A_{10} A_{25} A_{26} A_{34} A_{43} A_{66}
A_{19}	A_{29} A_{30} A_{31} A_{32} A_{33} A_{74}
B_5	B_5 B_{51} B_{52} B_{53} B_{18} B_{35} B_{70}
B_7	B_7 B_{13} B_{27} B_{22} B_{54} B_{55} B_{56} B_{40} B_{60} B_{61} B_{41} B_{42} B_{47} B_{48} B_{73}
B_8	B_8 B_{14} B_{16} B_{38} B_{57} B_{59} B_{64} B_{65} B_{39}
B_{12}	B_{12} B_{44} B_{45} B_{21} B_9 B_{50}

plement de la C_5 la C_9 cu proprietăți citolitice cu rol important în răspunsul organismului la agenți infecțioși, eliminarea complexelor imunte etc.

Controlul sintezei constituenților C_3-convertazei, care clivează C_3 modulând activarea constituentului central C_3, reprezintă unul din mecanismele de reglare ale răspunsului imun de către CMH.

Factorul BF(B) este o glicoproteină formată dintr-un lanț polipeptidic cu o greutate moleculară de 93 000 d. Este clivat enzimatic în două fragmente inegale — Ba și Bb (fig. XVI.11), ultimul intrând în formarea convertazei alterne.

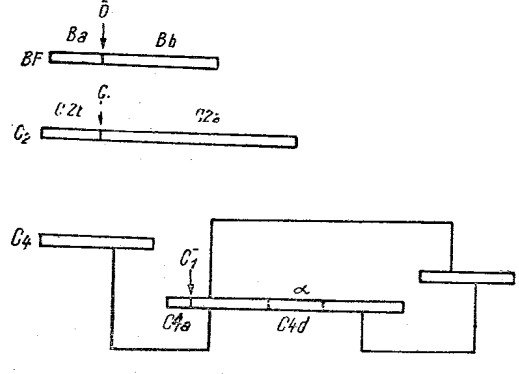


Fig. XVI.11. — Structura antigenelor de clasa a III-a (17).

Sistemul BF are un singur locus autosomatic cu patru alele care se exprimă în doză simplă: două alele comune F și S și două cu frecvență mică F_1 și S_1 (tabelul 16.V).

Alela S predomină la caucazieni, asiatici, iar F la negri. Grupele BF se transmit legate de sistemul HLA.

Până în prezent nu a fost descris nici un deficit total de

factor BF, dar existența unei alele silențioase BFQ0 (Q0=quantitativ zero) a fost postulată în două familii (17).

Factorul C_2 are o structură asemănătoare cu factorul BF (fig. XVI.11), dar are concentrații serice mai scăzute.

Sistemul C_2 are un singur locus apropiat de cel BF. Factorul C_2 are o alelă electroforetică principală C_2C cu frecvența cea mai mare și două

TABELUL 16.V

Frecvența antigenelor de clasa a III-a (după 17)

Alele	%
BF S	94,8
BF F	36,5
BF F1	2,6
BF S1	1,0
C_2C	99,7
C_2B	10,1
C_2A	0,6
C_2Q0	1,0
C_4A1	0,6
C_4A2	12,4
C_4A3	91,1
C_4A4	11,8
C_4A5	0,4
C_4A6	7,5
C_4AQ0	23,4
C_4B1	91,8
C_4B2	17,4
C_4B3	6,3
C_4B4	1,4
C_4B5	1,4
C_4BQ0	25,5

alele rare: C_2B și C_2A. Gena responsabilă de deficitul C_2 (C_2Q0) are o frecvență de aproximativ 1% și este transmisă asociată cu antigenele HLA într-un haplotip preferențial: HLA-A_{25}, B_{18}, BFS, C_4B, DR_2.

Factorul C_4 sau beta 1E-globulina are o GM de 206 000 d și este sintetizată ca un singur lanț polipeptidic, clivat ulterior în trei lanțuri (vezi fig. XVI.10). Lanțul central alfa este cel mai important. Din el derivă fragmentele C_4a (anafilatoxina) și fragmentul C_4d care rămâne legat de membrana celulei după fixarea de C_4b (componenta C_3 convertazei clasice); apoi se detașează partea inactivă C_4c.

Fragmentul C_4d poartă structurile responsabile pentru polimorfismul electroforetic al grupurilor Chido și Rodgers corespunzând produșilor locusurilor C_4B și C_4A. Se admite existența a două locusuri: C_4A și C_4B cu șase și respectiv șapte alele pentru fiecare din ele.

În regiunea C4 se află cartate şi genele 21 hidroxilazei (21-OH) cu rol în sinteza gluco- şi mineralocorticoizilor, 21-OHA în vecinătatea lui C_4A şi 21-OHB în vecinătatea lui C_4B. Ordinea locusurilor pe cromosom este următoarea: C_4A 21-OHA C_4B 21-OHB. În 1978 O'Neil a arătat letat legătura care există între C4 şi grupele Chido (Ch) şi Rodgers (Rg) descrie pe hematii şi în plasmă. Nu s-a observat o asociere caracteristică

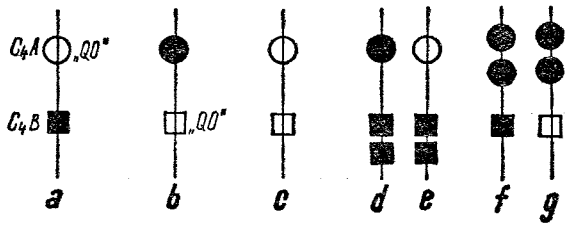


Fig. XVI.12. — Reprezentarea schematică a haplotipurilor C4 (17).
a şi b = haplotipuri „semi-nule";
c = haplotip nul;
d, e, f şi g = exemplu de duplicări.

pentru HLA cu C4. Totuşi deficitul C4 a apărut mai frecvent cu haplotipurile HLA-A_2 B_40 şi HLA-A_3O B_{18}.

Alelele nule C_4AQ0 şi C_4BQ0 sunt responsabile de deficite genetice parţiale, care sunt destul de frecvente. Subiecţii $C_4AQ0/AQ0$ homozigoţi sunt Rg(a—). Subiecţii $C_4BQ0/BQ0$ sunt Ch(a—). Produşii hemolitici activi sunt produşii locusului C_4B. De aceea homozigotismul $C_4BQ0/BQ0$ se însoţeşte de un deficit serios de C_4 (fig. XVI.12).

Peste 50% din alelele silenţioase se datoresc deleţiilor de gene C_4A sau C_4B. Toate deleţiile de gene C_4A sunt detectate într-un singur haplotip SCO1 care este frecvent în populaţia caucazoidă şi care este purtat de obicei de haplotipul A1 B8 DR3. Deleţia genei 21-OHA însoţeşte pe cea a genei C_4A. Deleţia C_4B apare în mai multe complotipuri şi se asociază totdeauna cu o deleţie a genei C_4B.

Produşii C_4A şi C_4B diferă net în proprietăţile antigenice. Astfel este posibilă aloimunizarea prin transfuzii sau sarcină. Aloimunizarea este la originea anticorpilor anti Rg (anti C_4A) sau anti Ch (anti C_4B). Ei nu dau accidente transfuzionale, dar pot produce intoleranţă faţă de produsele derivate din sânge care le pot conţine.

Asocierea între alelele complementului (complotipuri). Alelele celor patru locusuri BF C_2 C_4A şi C_4B determină combinaţii, adică haplotipuri de complement cunoscute sub numele de complotipuri.

De exemplu: BFS C_2C C_4A_3 C_4B_1 se foloseşte în mod egal şi denumirea prescurtată: BF*S* C_2C C_4AQ0 C_4B_1 = SCO*1* sau BFF*1*, C_2C C_4A_3 C_4BQ0 = FIC_3O.

Nomenclatura prescurtată nu corespunde topografiei actuale a locusurilor de complement C_2 BF C_4A C_4B. Se preferă utilizarea unei nomenclaturi care să respecte ordinea locusurilor. Scrierea asociată a complotipurilor cu alte alele este cunoscută sub denumirea de „haplotip extins".

Nu s-a observat nici o recombinare între cele 4 locusuri ale fracţiunilor de complement de pe cromosomul 6.

Factorul BF este prima componentă a complementului a cărei structură genică completă a fost caracterizată în întregime.

Gena C_2 a fost de asemenea clonată, dar structura ei nu este complet determinată. Analiza în Southern Blot a regiunii genelor C_2 şi BF

a decelat un alt tip de polimorfism în populație, definit prin lungimea unui fragment de ADN (tehnica RFLP). Lungimea fragmentelor de restricție este, în general, fără traducție proteică, dar reprezintă markeri adiționali care măresc alelismul fiecărui locus. Talia moleculei de C_4 (în jur de 1 000 AA) și existența unui număr mare de alele pentru cele două izotipuri C_4A și C_4B au făcut dificilă secvențarea completă a acestor proteine prin tehnici biochimice și au condus la clonarea și secvențarea ADNc care codifică pentru C_4A și C_4B.

Relațiile haplotipurilor HLA complement cu unele boli (tabelul 16.VI).

TABELUL 16.VI

Câteva din principalele haplotipuri sau fragmente de haplotipuri asociate cu boli (după 17)

Boala	Haplotipurile corespunzătoare							
Boli autoimune								
DID (1)	A_1	Cw7	B8	S	C	Q0	B1	DR_3
DID (2)	A_2	Cw3	B15	S	C	A3	Q0	DR_4
DID (3)	A_{30}	Cw5	B18	F1	C	A3	Q0	DR_3
Deficit de C2	A_{25}	—	B18	S	Q0	A4	B2	DR_2
SA	—	Cw1	B27	S	C	A4	B2	—
	—	Cw2	B27	S	C	A3	B1	—
Deficit congenital de 21-hidroxilază	A_3	Cw6	B47	F	C	Q0	—	DR_7
	Aw_{33}	—	B14	S	C	A2	B2	DR_1
Hemocromatoză	A_3	—	B7	S	—	—	—	DR_2
	A_3	—	B14	F	—	—	—	DRw_6
Scleroză în plăci	A_3	Cw7	B7	S	—	—	—	DR_2
Poliartrită reumatoidă	—	Cw3	B62	S	—	A3	—	DR_4
Subiecți buni răspunzători la stimuli antigenici	A_{24}	—	B52	—	—	—	—	DR_{12}

Două treimi din subiecții care au deficite de C_2 și C_4 suferă de o boală de sistem, în special lupus eritematos. La acești bolnavi s-au găsit anticorpi față de un antigen nuclear solubil Ro. Ei sunt, de obicei, HLA-DR_3 sau DR_2 pozitivi, sau antigenul DR_3 este asociat cu o alelă nulă (C_4AQ0 sau C_4BQ0, iar DR_2 cu o alelă nulă C_2Q0. Este posibil ca antigenul Ro să fie legat de o infecție virală. Această infecție ar putea fi favorizată de un deficit parțial sau total de C_2 sau C_4, care ar conduce la formarea de anticorpi anti Ro responsabili de leziunile observate.

Diabetul insulinodependent (DID): haplotipurile de „sensibilitate" comportă fie o alelă nulă C_4AQ0 sau C_4BQ0 fie alele rare, ca BFF_1 sau C_4B_3. Haplotipul „protector" HLA-A_3 B_7 DR_2 se asociază cu variantele comune BFS C_2C și C_4A_3 B_1, DID se asociază în principal cu antigenul HLA-DR_3 care, așa cum s-a arătat, se asociază cu alele nule C_4. S-a observat o frecvență crescută a homozigoților C_4BQ0 în diabetul survenit precoce și s-a sugerat că deficitul de C_4 ar putea antrena o susceptibilitate mai mare la infecții virale, responsabile de apariția bolii. Tot în

DID s-a arătat recent că lipsa unui reziduu de acid aspartic în poziția 57 a lanțului DQB (DQw8 β) predispune la boală, pe când prezența acestuia în același loc (lanțul DQw7 β) protejează de boală.

Alte boli: în psoriazis se întâlnește cu frecvență crescută alela C_4A_6; 27% la bolnavi, față de 9% în populația de control.

La bolnavii cu lepră, mai ales în populațiile de culoare din Africa, se întâlnește frecvent alela F1. Nefropatia cu IgA se asociază cu DR_3 C_4BQ0.

Genele de complement legate de genele HLA reprezintă un grup de markeri descoperiți recent, cu polimorfism important. Complotipurile sunt markeri suplimentari, adesea specifici unor haplotipuri HLA. Interesul determinării acestor markeri este mare pentru studii populaționale, transplantarea de organe, corelații cu unele boli. În transplantarea de măduvă, în cazul bolnavilor cu leucemie sau deficite imune în care determinarea antigenelor HLA este dificilă, folosirea fracțiunilor de complement devine deosebit de utilă.

Recent, s-a semnalat o frecvență crescută a alelelor BFF1 C_4AQ0 și C_4BQ0 la subiecți Rh(D) negativi, care dezvoltă un titru mare de anticorpi anti-Rh după sarcină sau imunizare provocată. Se presupune că răspunsul la antigenul Rh(D) este controlat de o genă legată de HLA și marcată de alelele nule C_4A și C_4B.

Semnificația legăturii între HLA și complement. Studiind sinteza de C_2, C_4 și factor BF, s-a văzut că segmentul cromosomic 6 cu regiunea HLA de pe el controlează cele 2 căi de activare ale complementului prin formarea C_3 convertazei, ceea ce permite activarea componenților secvenței de „atac al membranei" și expresia principalelor activități biologice ale sistemului. Activitățile biologice ale C_2, C_4 și BF privesc în special activarea monocite/macrofage, permeabilitatea vasculară, neutralizarea virală, fenomenele de imunoaderență și eliminarea complexelor imune circulante.

COMPLEXUL MAJOR DE HISTOCOMPATIBILITATE ȘI RĂSPUNSUL IMUN

Rolul CMH în răspunsul imun este legat de conceptul de gene de răspuns imun, fenomenul de restricție și selecția determinanților antigenici.

Fenomenele de restricție și controlul genetic al răspunsului imunitar sunt două consecințe ale aceluiași fenomen: recunoașterea în asociere. Limfocitele T nu recunosc un antigen străin X izolat, ci în asociere cu molecule de clasa I sau a II-a CMH: X+CMH.

Acest complex major de histocompatibilitate este recunoscut de un singur receptor de celule T(TcR), fapt demonstrat prin transfecția de gene ale TcR care conferă celulei transfectate atât specificitatea pentru antigenul X, cât și pentru molecula de restricție a CMH.

Pe suprafața limfocitelor există o serie de receptori neimplicați direct în recunoașterea specifică, dar esențiali pentru răspunsul imun; aceștia sunt:

— complexul CD_3 implicat în activarea celulară;

— complexul CD_4 care defineşte funcţia de Th;
— complexul CD_8 care defineşte funcţia de celulă Tc şi Ts.

Studiul cu ajutorul clonelor de limfocite TT a stabilit că cea mai mare parte a limfocitelor care reacţionează cu molecule de clasa I a CMH sunt celule CD_8. În timp ce limfocitele care reacţionează cu moleculele de clasa a II-a a CMH sunt celule CD_4.

Recunoaşterea în asociere ţine cont de intervenţia CMH în controlul genetic al răspunsului imun. Moleculele CMH dictează capacitatea individului de a răspunde sau nu la un antigen X, adică se comportă ca un reglator de răspuns imun. CMH intervine în răspunsul imun în două moduri: fie la nivelul prezentării antigenului (CMH prezintă sau nu antigenul), fie la nivelul recunoaşterii: limfocitul T recunoaşte sau nu asocierea *X+CMH*. Ambele condiţii sunt necesare şi complementare.

Pentru a se dezvolta un răspuns imun este necesară existenţa unei cooperări între celulele imunitare: macrofage, limfocite T, limfocite B.

Kat (1974) a demonstrat că macrofagele şi limfocitele Th nu pot coopera în răspunsul imun dacă nu au în comun molecule de clasa a II-a. El a repopulat şoareci iradiaţi cu macrofage şi limfocite provenind de la linii genetice diverse, neavând sau având în comun doar un element de clasa a II-a. Răspunsul imun nu a fost posibil decât dacă între macrofage şi limfocite T a existat în comun o moleculă de clasa a II-a, condiţie pe care a numit-o specificitate de restricţie (62).

În 1974, Zinkernagel şi Doherty au arătat un fenomen asemănător pentru moleculele de clasa I. Celulele infectate de un virus pot fi distruse de celule Tc specifice pentru acest virus, dacă au în comun cu celula ţintă molecule de clasa I (restricţie de clasa I). În primele experienţe ei au infectat diverse linii de şoarece cu virusul choriomeningitei limfocitare; după 7 zile au testat capacitatea limfocitelor de la aceşti şoareci de a liza fibroblaşti $H\text{-}^{2k}$ infectaţi cu virus şi au observat că limfocitele de la şoareci $H\text{-}^{2k}$ lizau aceste celule, în timp ce limfocitele cu alte haplotipuri nu lizau. Ei au interpretat fenomenul ca recunoaştere în asociere şi simultană de către Tc a moleculelor codificate de genomul viral şi o moleculă a CMH. Acest fenomen a putut fi blocat de anticorpi anti CMH. La om s-au obţinut aceleaşi rezultate pentru imunizarea antivirală, gripă, rujeolă, parotidită, citomegalovirusuri, virus Epstein-Barr.

Răspunsul la antigene străine este controlat genetic de CMH observându-se subiecţi „care răspund" (R) şi subiecţi „care nu răspund" (NR).

Studii pe animale consanguine (cobai, şoareci) au demonstrat transmiterea mendeliană dominantă a caracterului R.

Fenotipul R sau NR s-ar putea explica prin generarea sau nu de limfocite Th. În unele cazuri, fenotipul NR este explicat prin generarea de limfocite Ts (supresoare).

În cadrul fenomenului de restricţie există atât la şoarece, cât şi la om „molecule preferate pentru recunoaşterea în asociere". În general, limfocitele Tc distrug preferenţial ţintele autologe infectate faţă de cele alogene infectate.

Limfocitele Tc antivirus gripal recunosc preferenţial antigenele $HLA\text{-}A_1$, A_3, B_7, B_{21}, B_{27} mai mult decât specificitatea $HLA\text{-}A_2$ (Mc Michael).

În parotidită sunt preferate antigenele locusului HLA-B; B_{18}; B_{27}; B_{35}; B_{62}; B_{63}. Invers, la subiecții homozigoți pentru antigenul HLA-B_8, răspunsul Tc este slab ⟨Kress și Kreth, 1989; (cit. în 17)⟩.

În toate aceste exemple, răspunsul imun a fost „restrâns" la nivelul moleculelor CMH citate mai sus.

Genele de clasa I, prin intermediul produșilor lor, controlează activitatea Tc: ele se comportă ca gene de răspuns imun (gene I r). Restricția și controlul genetic al răspunsului imun sunt două aspecte ale aceleiași probleme.

Preferința de restricție se referă la faptul că anumite antigene de clasa I și a II-a nu au aceeași eficiență în a prezenta un virus sau un antigen. Acest fenomen s-a încercat să se explice prin ipoteza selecției determinanților și deocamdată privește restricția de clasa a II-a.

Antigenele proteice pentru a stimula un răspuns imun trebuie să fie mai întâi degradate sub formă de peptide imunogene de către macrofage, care apoi le prezintă limfocitelor Th împreună cu molecule de clasa a II-a.

Th are receptor TcR care recunoaște în asociere moleculele de clasa a II-a și peptidele imunogene.

Moleculele de clasa a II-a nu pot prezenta limfocitului Th toate peptidele; există o competiție între diferitele peptide pentru fixarea pe o aceeași moleculă CMH. Astfel se poate vorbi de o selecție de determinanți prin moleculele de CMH prezentatoare de antigen.

Pentru a se trece la etapa următoare, trebuie ca în repertoriul limfocitelor T să existe receptori TcR care să recunoască complexul CMH+X. Dacă repertoriul este complet, statutul de R sau NR nu depinde decât de selecția determinanților. Unele observații au sugerat că repertoriul T nu este complet și comportă pete oarbe *(blind spots)* adică nu se recunosc toate complexele CMH+X posibile.

Când X+*CMH* propriu este asemănător cu CMH propriu sau CMH propriu+structuri autologe, subiectul nu răspunde la X, este deci NR. Clonele T purtătoare de receptori corespunzând celor două structuri sunt eliminate (deleția în repertoriu duce la lipsă de răspuns la antigenul X, adică toleranță). Toleranța poate fi generată și de producția de celule Ts. Lipsa de răspuns la X+CMH ar fi deci consecința unei supresii.

Toleranța naturală a CMH propriu este consecința dispariției fizice sau funcționale a clonelor capabile să le recunoască. Repertoriul T este anti X+CMH propriu și este modulat de CMH propriu. Dacă X+CMH propriu este similar sau identic cu CMH propriu sau cu CMH propriu+proteine proprii, X nu este recunoscut de individ și nu răspunde la X. Se creează o toleranță față de CMH propriu. CMH este deci un sistem reglator al răspunsului imun timodependent.

Funcțiile neimunologice asociate cu CMH se datoresc fie produșilor unor gene legate de CMH, fie produșilor genelor CMH însele și sunt multiple:

— rol în dezvoltare: s-a demonstrat la șoareci că există o genă Ped *(preimplantation embryo development)*. legată de CMH, care influențează viteza de diviziune a celulelor embrionare înainte de implantare;

— influențează adeziunea celulară în culturi;

— inhibă contactele celulare, prevenind formarea agregatelor în culturi, în funcție de haplotipurile în comun;

— capacitatea unei tumori de a metastaza prin creșterea malignității sale, se însoțește de modificarea antigenelor de suprafață a celulelor tumorale. Implicarea CMH în progresia unor tumori a fost sugerată de diferențele în expresia moleculelor CMH pe tumoarea primară și pe metastazele ei. S-a sugerat că moleculele H-2 sunt implicate în competitivitatea între celulele tumorale și cele normale ale gazdei, ea determinând comportamentul tumorii (59);

— CMH influențează nivelul AMP ciclic;

— interacționează cu receptori de membrană:

Receptori pentru insulină: asocierea sa cu molecule H-2 a fost demonstrată de Simonsen. El a observat că fenomenul de „capping" (regruparea la un pol a celulei) a moleculelor H-2K la șoarece indus de anticorpi anti clasa I reduce fixarea insulinei de receptor în aceeași proporție cu un „capping", efectuat cu anticorpi specifici pentru receptorul insulinei însăși.

CMH poate forma pe membrana celulei noi receptori cu afinitate crescută pentru moleculă.

Receptori pentru glucagon: fixarea glucagonului este influențată de CMH.

Receptori pentru tromboxan 2 și endoperoxidaze: s-a observat că anticorpi anti beta-2-microglobulina umană sunt capabili să inhibe agregarea plachetară care apare după o leziune vasculară prin acțiune pe tromboxani.

S-a descris la mamifere posibilitatea inducerii unei fante palatale prin cortizon administrat între ziua a 13-a — a 18-a de gestație; genele CMH sunt implicate în această afecțiune.

Rolul CMH în aceste activități neimunologice este controversat și încă în studiu.

IMPLICAȚII MEDICALE ALE SISTEMULUI HLA

Studierea antigenelor HLA are un domeniu larg de aplicare în: transfuzie, izoimunizarea materno-fetală; transplantarea de organe și țesuturi, testarea paternității, corelarea cu diferite boli, studii antropologice și populaționale.

Antigenele HLA și transfuzia de sânge. Studiul antigenelor de histocompatibilitate a pornit de la cunoașterea reacțiilor febrile nehemolitice posttransfuzionale, la bolnavi politransfuzați sau femei multipare cărora li s-a administrat un sânge perfect compatibil pentru antigenele eritrocitare. S-a considerat că aceste reacții se datoresc anticorpilor antileucocitari și antitrombocitari existenți în sângele acestor subiecți.

Transfuziile de leucocite și trombocite se folosesc ca mijloace terapeutice substitutive în caz de granulocitopenii sau trombocitopenii severe.

Pe lângă dificultățile de ordin tehnic în prepararea acestor concentrate celulare, transfuzarea lor ridică o serie de probleme de ordin imunologic, legate de prezența anticorpilor din sângele primitorului.

În cazul tratamentului cu concentrate leucotrombocitare pot apărea imunizări față de două tipuri de antigene.

a) *Antigene pluritisulare* prezente pe eritrocite, granulocite, limfocite, trombocite, cum sunt: antigenele de grup sanguin (AB0, Le, MNSs, Kell, Kidd); antigenele HLA de clasa I, prezente pe toate celulele nucleate din organism, dar cu expresie variabilă pe diferite celule; pe hematii s-au pus în evidență cu tehnici ultrasensibile câteva antigene HLA: B_7, B_{17}, A_2, B_{15}, B_{18}, B_{22}.

Pe granulocite, antigenele de clasa I sunt bine reprezentate. La fel și pe trombocite, fiind exprimate mai bine la câteva zile de la recoltare, cu excepția antigenului HLA-B_{12} care este slab reprezentat. Limfocitele sunt cele mai bogate celule în antigene HLA.

Antigenele de clasa a II-a sunt reprezentate pe limfocite B, monocite, celule T stimulate.

b) *Antigene proprii leucocitelor și trombocitelor:* antigene proprii granulocitare: sistemul NA, NB, NC, ND, NE, sistemul 9 etc.; antigene proprii trombocitare, sistemul Duzo, Pl^A (cu 2 alele Pl^{A1} și Pl^{A2}), Pl^E (cu 2 alele Pl^{E1} și Pl^{E2}), Ko (cu 2 alele Ko^a și Ko^b), Bak (cu alela Bak^a), Lek (cu alela Lek^a), Yuk (cu alelele Yuk^a și Yuk^b). Ultimele două antigene sunt încă în studiu. Sistemul Yuk ar fi echivalentul japonez al sistemului Pl^A de la populația caucaziană.

Antigene monocitare: s-au descris două alele HMA care sunt identice cu alele NB1 și NB2 sau alela 9a (Lalezari, 1982).

Efectul clinic al terapiei cu concentrate leucoplachetare se reduce treptat pe măsură ce bolnavii se imunizează, ajungând într-o stare „refractară". Majoritatea reacțiilor febrile observate după transfuzia de leucocite și trombocite sunt secundare imunizării față de antigenele HLA.

Pentru ca trombocitele transfuzate să fie eficiente este necesar să se administreze bolnavului acele trombocite, care poartă pe suprafața lor antigene HLA față de care nu este imunizat. Transfuzia de trombocite trebuie precedată de o probă de compatibilitate directă *(cross match)* între serul primitorului și limfocitele donatorului prin testul de microlimfocitotoxicitate care trebuie să fie negativ (30).

Și în cazul transfuziei de leucocite, ideal este să se administreze leucocite compatibile pentru sistemul HLA. *Cross match*-ul se face printr-o tehnică de aglutinare, granulocitotoxicitate sau imunofluorescență.

Succesul clinic al transfuziei de leucocite și trombocite este influențat de numeroși factori, dintre care compatibilitatea între diferite sisteme imunogenetice în care sistemul HLA (antigene de clasa I) este predominantă, mai ales în transfuzia de trombocite. Celelalte antigene proprii granulocitare și trombocitare au și ele un rol important, dar sunt mai puțin imunogene ca sistemul HLA.

Antigenele HLA și izoimunizarea materno-fetală. Încă din 1954 Dausset a arătat că imunizarea față de antigenele de pe leucocite și trombocite poate fi indusă nu numai prin transfuzie, ci și prin sarcină. În timpul sarcinii, mama se poate imuniza față de antigenele HLA pe care copilul le moștenește de la tată. Imunizarea începe în jurul lunilor V—VI. Frecvența imunizării variază între 5 și 20%, fiind mai mare la multipare. Imunizarea gravidelor prin sistemul HLA reprezintă, în momentul de față, sursa cea mai ieftină de obținere a serurilor anti-HLA reactivi,

folosite la testarea antigenelor HLA. De obicei, aceste seruri sunt polispecifice, imunizarea făcându-se față de toate antigenele care dau reacții încrucișate. Șansa de obținere a unui ser monospecific este de 1/400—1/500 gravide imunizate. Prezența anticorpilor anti-HLA citotoxici în serul matern poate duce la leucopenii sau trombopenii tranzitorii ale nou-născuților.

Antigenele HLA și transplantarea de organe. Grefele la animale și grefele experimentale la om între subiecți normali au arătat că histocompatibilitatea și imunosupresia sunt elemente esențiale în acceptarea grefelor de către organism.

Rolul antigenelor HLA în transplantarea de organe a fost sugerat chiar de la începutul investigării acestui sistem, de observația că grefele de rinichi între frați HLA identici supraviețuiesc mai bine decât cele de la donatori neînrudiți. De asemenea, s-a observat că o a doua grefă de la același individ este respinsă mai repede decât prima. A devenit clar că structurile antigenice de suprafață comune pe leucocite și țesuturi sunt determinanți de histocompatibilitate (35).

De un număr de ani se realizează grefe de piele, os și cornee. Acestea sunt grefe „homostatice", care joacă rolul unic de suport organic pentru celulele primitorului care vin și colonizează breșa tisulară, în timp ce celulele grefate sunt respinse. În aceste condiții ele nu pun probleme imunologice.

Din contră, în grefele „homovitale", celulele grefonului supraviețuiesc în organismul primitorului, realizând ceea ce se numește o „himeră", în care conviețuiesc două populații de celule cu origine genetică diferită.

Compatibilitatea între grefă și gazdă depinde în întregime de raporturile genetice care există între donatorul și primitorul de grefă. Grefa compatibilă este grefa în care donatorul și primitorul sunt genetic identici: *grefa autologă — autografa*, în care grefonul provine de la însăși gazda; *grefa singeneică — izografa* se realizează între gemeni univitelini, care sunt de fapt singurii indivizi cu adevărat identici.

Grefa incompatibilă este grefa în care primitorul și donatorul sunt genetic diferiți: *grefa alogenă* sau alografa, grefă între indivizi de aceeași specie, dar diferiți genetic (este situația cel mai frecvent întâlnită în transplantele umane); grefa xenogenă, xenografa, heterografa este grefa între indivizi de specii diferite. Cea mai frecventă grefă de organe este grefa de rinichi.

Fenomenul de respingere al unei grefe incompatibile rezultă dintr-o reacție imunologică între grefă și gazdă în care diferențele genetice între primitor și donator joacă rol major. În această reacție antigenele de clasa I CMH sunt ținte pentru celulele citotoxice și anticorpii citotoxici, iar antigenele de clasa a II-a CMH, care au rol mai ales în inițierea răspunsului imun, sunt ținta recunoașterii non-selfului și uneori pot servi ca țintă pentru celulele citotoxice.

Transplantul de rinichi. Începând cu 1964, data primului transplant renal încoronat de succes, realizat între doi gemeni, peste 100 000 de bolnavi cu insuficiență renală cronică au putut beneficia de o grefă de rinichi.

Histocompatibilitatea a contribuit la ameliorarea supraviețuirii grefei în etape succesive: practicarea compatibilității directe *(cross match)* înainte de grefare între serul primitorului și limfocitele donatorului (1965), genotipul HLA în grefele intrafamiliale (1967), compatibilitatea între donator și primitor pentru antigenele HLA-A și B (1972), transfuziile de sânge (1973), compatibilitatea HLA-DR (1978).

Existența unor reacții de respingere a grefei între frați HLA identici a determinat luarea în considerare și investigarea în afara CMH și a altor factori și sisteme imunogenetice (sexul, antigenele eritorcitare, AB0, P, Lewis, Rh, antigenele de grup E) și, în final, evaluarea statusului imun al primitorului (9).

Donatorul de rinichi poate fi donator viu înrudit sau un cadavru (bolnav în comă depășită). În cazul donatorilor vii se selecționează cel mai bun donator pentru un primitor.

În grefele de rinichi de la cadavru este invers: se selecționează cel mai bun primitor pentru un donator, aceasta pentru a se scurta la maximum perioada de conservare a rinichiului (maximum 50 de ore) (21).

Testele pentru selecționarea perechilor de donatori primitori pentru grefe de rinichi sunt:

(1) determinarea antigenelor eritrocitare în sistem AB0, Rh, P etc.;
(2) determinarea antigenelor CMH clasa I, clasa a II-a;
(3) *cross match* între serul primitorului și limfocite de la donator;
(4) *screening* periodic al serurilor de primitori pentru anticorpi citotoxici.

Studiul *supraviețuirii grefonului* după grefe renale intrafamiliale a permis să se stabilească o corelare foarte bună între numărul de haplotipuri în comun între donator și primitor. Astfel, în cazul donatorilor HLA identici cu primitorul, supraviețuirea grefei a fost de 95% la 1 an și 85% la 5 ani, față de 75% la 1 an și 65% la 5 ani în cazul subiecților semiidentici.

Transplantarea între frați care nu au nici un haplotip comun, duce la o supraviețuire a grefei comparabilă cu cea de la cadavre neînrudite, semiidentice cu primitorul.

Transplantarea între subiecți neînrudiți HLA identici nu duce la rezultate prea bune datorită existenței locusurilor minore de histocompatibilitate care pot determina reacția de respingere (14).

În ceea ce privește grefele de rinichi de la cadavre, este necesară asigurarea celei mai bune compatibilități HLA. Testarea HLA a donatorului se face cu limfocite din splină, ganglioni limfatici sau sânge.

Studii statistice, pe un număr mare de persoane grefate, au sugerat importanța compatibilității donator-primitor pentru fiecare locus.

Rolul compatibilității pentru locusurile A și B este controversat datorită numărului mare de alele care îngreuiază găsirea unor persoane HLA identice. Compatibilitatea pentru antigenele de pe locusul B este mai importantă decât pentru antigenele de pe locusul A.

Antigenele HLA-C fiind puțin imunogene nu influențează soarta unei grefe și incompatibilitatea HLA-C nu se ia în considerare.

Rolul antigenelor HLA-D, măsurat prin gradul de stimulare în cultura mixtă limfocitară, influențează supraviețuirea grefei. Există, în general, o bună corelare între cultura mixtă nestimulatorie și o supravie-

țuire îndelungată a grefei. Datorită timpului lung necesar efectuării acestui test, pentru grefa renală de la cadavre el are doar valoare prognostică.

Compatibilitatea pentru locusul HLA-D poate fi realizat indirect prin tipizare serologică HLA-DR și DQ; identitatea pentru aceste două locusuri se însoțește de nestimulare în cultura mixtă.

Locusul DR pare să joace rolul cel mai important; se știe astăzi că incompatibilitatea DR între donator și primitor reprezintă stimulul major care declanșează răspunsul imun în grefa renală.

Supraviețuirea grefelor DR compatibile este superioară celor DR incompatibile.

Numărul mic de alele DR permite mai ușor găsirea unui donator compatibil cu primitorul. S-a calculat că pentru 300 de primitori este posibil să se găsească un donator DR compatibil în 95% din cazuri.

Rolul compatibilității DR crește la a doua, a treia grefare etc.

Gradul de compatibilitate A și B nu pare să influențeze grefele DR compatibile.

În absența compatibilității DR se va asigura compatibilitatea pentru locusurile A și B.

În cazul existenței unor incompatibilități între donator și primitor, rezultatele sunt mai bune când antigenele incompatibile dau reacții serologice încrucișate.

Nu toate antigenele HLA sunt la fel de imunogene. Antigenul HLA-A11 este o „incompatibilitate bună"; la nivelul locusului DR, incompatibilitatea HLA-DRw6 dă cele mai nesatisfăcătoare rezultate.

Grefa cardiacă. Lipsa unui organ artificial de înlocuire și urgența de a găsi un donator împiedică efectuarea unei bune compatibilități. Absența unei grefe perfect compatibile împiedică concluzii certe asupra rolului compatibilității HLA în grefele cardiace.

Unele studii retrospective au arătat că asigurarea compatibilității pentru antigenele HLA-A_2 și A_3 luate separat îmbunătățește supraviețuirea grefei cardiace fără a putea însă explica dacă aceste două antigene au un rol particular în grefele cardiace. Se respectă compatibilitatea AB0 și *cross match* negativ.

Grefa de ficat. Compatibilitatea AB0 este convenabilă. Compatibilitatea HLA nu este un factor primordial pentru supraviețuirea grefei. Grefe incompatibile în sistemul AB0 și cu *cross match* pozitiv au fost reușite. Din acest grup s-au citat totuși reacții de respingere supraacute.

Practic, în situații neurgente se respectă compatibilitatea AB0 și *cross match* negativ.

În situații de urgență, care sunt mai frecvente, se face grefă fără compatibilitate AB0 și HLA.

Grefa de ficat. Compatibilitatea AB0 este convenabilă. Compatibili- încă suficiente date privind rolul antigenelor HLA în supraviețuirea grefei. La acestea se adaugă și dificultățile tehnice care fac să existe o mortalitate crescută. De asemenea, există puține date privind importanța antigenelor HLA în grefele de *piele* și *os*, acestea efectuându-se de obicei fără nici o selecție imunologică a donatorului și fără tratament imuno-

supresiv la primitor, histocompatibilitatea având importanță la a doua sau a treia grefă.

Grefa de cornee: pe un lot de 100 de grefe cu vascularizația grefonului (deci susceptibile de a fi respinse) s-au observat 26% respingeri la un an în caz de 2 identități HLA între donator și primitor, față de 56% și 62% în caz de una sau zero identități.

Compatibilitatea DR este mai importantă decât cea HLA-A, B, C, deoarece antigenele DR sunt bine reprezentate pe cornee.

În cazul grefelor de piele și de cornee existența băncilor de țesuturi cu conservarea nelimitată în azot lichid va permite progresiv asigurarea compatibilității HLA între donator și primitor.

Transplantul de măduvă osoasă (Mo) (vezi cap. respectiv în vol. II).

Sistemul HLA în testarea paternității. Polimorfismul sistemului HLA și raritatea uneia dintre alelele sale conferă CMH o valoare informativă deosebită în expertiza medico-legală a paternității.

Sistemul HLA întrunește toate condițiile pe care trebuie să le îndeplinească un sistem genetic pentru studii în medicina legală: markerii sunt exprimați pe celule de la naștere (chiar și la fetus din a 6-a săptămână) și rămân constanți toată viața; modul de moștenire este clar (transmiterea mendeliană este bine stabilită prin studiul unui număr mare de familii; frecvența recombinărilor între cele două locusuri A și B este sub 1%; nu s-a observat nici o deleție a vreunui antigen, ceea ce ar putea conduce la concluzii fals pozitive); tehnica de determinare a antigenelor HLA este relativ simplă și reproductibilă.

În cercetarea filiației sunt folosite două metode: tehnica de excludere și tehnici statistice de calcul al probabilității de paternitate.

Într-o cercetare de paternitate trebuie cunoscute fenotipurile HLA ale copilului, mamei și tatălui presupus. Cunoscând antigenele HLA moștenite de copil de la mamă se pot calcula haplotipurile acestui cuplu. Cum un haplotip de la copil provine de la mamă, celălalt haplotip trebuie să provină de la tată. Prin analiza genetică se poate astfel să se recunoască dacă prezența acelui haplotip este sau nu posibilă la tatăl presupus. Trebuie însă să se țină seama întotdeauna și de posibilitatea existenței unei recombinări între antigenele unor locusuri învecinate, cu crearea unui nou haplotip.

Indicele de paternitate $\left(\frac{X}{Y}\right)$ reprezintă un raport între probabilitatea tatălui presupus de a contribui cu antigenele necesare (notată cu x) și probabilitatea de a transmite aceleași antigene de către un subiect luat la întâmplare din populație (notată cu y).

Probabilitatea este egală cu frecvența acestor antigene (sau a haplotipului) în populația de aceeași origine etnică. Cu ajutorul acestui indice se calculează *posibilitatea de paternitate* (w), care derivă din formula lui Möler:

$$W = \frac{\frac{X}{Y}}{1+\frac{X}{Y}}$$

Tabelele lui Hemmels stabilesc arbitrar transformarea posibilității de paternitate (w) în probabilitate de paternitate.

Pe măsură ce se studiază noi markeri probabilitatea de paternitate a tatălui presupus este reevaluată. Valoarea rezultatelor obținute va fi cu atât mai mare cu cât numărul de markeri genetici analizați va fi mai mare.

Interesul sistemului HLA pentru medicina legală. Studiul antigenelor HLA în cercetarea paternității s-a dovedit util și în situațiile în care unul din părinți este decedat, prin studierea fenotipurilor la copil-mamă sau copil-tată presupus și la alți membri din familie. De asemenea, este citată stabilirea de 2 tați biologici pentru gemeni bivitelini, cu ajutorul tipizării HLA.

În cazurile de schimbări de copii, markerii HLA, chiar izolați, pot stabili adevărul. Deși rolul sistemului HLA în cercetarea paternității este deosebit de important datorită polimorfismului său, utilizarea pe scară largă este greu de efectuat datorită costului ridicat al serurilor și necesității de a avea reactivi de calitate excepțională, dotării materiale care nu este la îndemâna oricărui laborator, corelată cu experiența unui expert HLA. Întotdeauna această cercetare va fi efectuată în final, după epuizarea celorlalte sisteme genetice.

Corelarea antigenelor HLA cu unele boli. În ultimii ani numeroase studii au urmărit și sugerat corelarea unor boli cu antigenele de histocompatibilitate din sistemul HLA. Inițial asocierea s-a făcut pentru afecțiuni generate de un răspuns imun anormal. Ulterior s-a constatat că diferite boli au o mai mare probabilitate să se producă la persoane purtătoare de anumite configurații antigenice HLA.

Primele lucrări privind asocierea antigenelor de histocompatibilitate cu anumite boli datează din anul 1967 când s-au studiat antigenele HLA în boala Hodgkin și leucemiile acute. Studiul intensiv al acestor antigene începe însă în anul 1972, odată cu surprinzătoarea descoperire a asocierii între antigenele HLA-B_8 cu boala celiacă și HLA-B_{13} cu psoriazis. În anul următor este descoperită cea mai puternică asociere între un antigen de histocompatibilitate și o boală: antigenul HLA-B_{27} și spondilita anchilozantă (SA).

În același timp a devenit clar că asocierea cu antigenele HLA-D în unele cazuri poate fi mai puternică decât cea cu antigenele HLA-A și HLA-B. Când tipizarea pentru antigenele HLA-DR a devenit posibilă și utilizată pe scară largă, asocierea cu antigenele HLA-DR a fost confirmată și au fost găsite noi asociații.

După descoperirea în 1972 a unei asociații strânse între spondilita anchilozantă și antigenul HLA-B_{27} a fost demonstrată prin studii populaționale și familiale existența de asociații a diverse antigene HLA de clasa I și a II-a cu peste 100 de boli, care deși au un spectru diferit de manifestări, posedă câteva caractere comune: dispoziție ereditară, dar cu penetrație slabă, etiologie neprecizată, anomalii imunologice, uneori cu componentă autoimună, evoluție subacută sau cronică ș.a. Prezența unui haplotip HLA asociat cu o boală la un subiect nu implică însă că acesta va face obligator boala, după cum o boală cunoscută a fi asociată cu un anumit antigen HLA poate să se dezvolte la o persoană care nu

posedă antigenul respectiv. Prezența la un subiect a unui antigen asociat cu o boală are mai mult semnificația unui factor de risc pentru boala respectivă.

Grupul de boli la care s-a găsit o asociere sau o legătură cu factorii HLA cuprinde de la boli cu patogenie clar imună (boala celiacă, lupus eritematos diseminat, miastenia gravă), la boli cu patogenie autoimună probabilă (diabet insulinodependent, tireotoxicoză, artrită reumatoidă) sau boli cu etiologie necunoscută (scleroză în plăci, psoriazis) ori fără anomalii imunologice (hemocromatoza, hiperplazia corticosuprarenală) etc.

În studiul corelării antigenelor HLA cu diverse boli se folosesc două metode: studii populaționale cercetând o asociere statistic semnificativă între o boală și un antigen HLA particular și studii familiale multiple cercetând o legătură între o genă de susceptibilitate la o boală și gena HLA marker. În cadrul primei metode se compară frecvența markerilor studiați la o serie de bolnavi neînrudiți cu frecvența markerilor la populația de aceeași vârstă, sex și origine etnică. Semnificația statistică se calculează după testul X^2.

Când o asociere între un antigen HLA și o boală este recunoscută, este important să se determine riscul relativ (RR) de boală, ca și riscul personal de îmbolnăvire. RR indică ori de câte ori se dezvoltă mai frecvent boala la subiecții purtători ai unui anumit antigen în raport cu cei care nu au acel antigen (47). Riscul relativ se determină cu ajutorul formulei:

$$X = \frac{pm(1-pc)}{pc(1-pm)}$$

pm = frecvența antigenului la bolnavi
pc = frecvența antigenului la lotul de control.

Un RR peste 1 indică o asociere pozitivă, în timp ce RR sub 1 traduce o asociere negativă. Asocierea unei boli cu un antigen HLA este cu atât mai strânsă cu cât riscul relativ crește peste 1.

A doua metodă folosește studiile familiale care au avantajul de a permite depistarea unor „gene de boală" legate de antigenele HLA, chiar dacă nu s-a găsit vreo asociere în populație. Deosebit de informative sunt familiile cu mai mulți bolnavi: se compară segregarea susceptibilității la boală cu cea a haplotipurilor HLA. În cazul existenței unei legături HLA-boală, subiecții bolnavi sunt HLA identici.

Susceptibilitatea la boală transmisă cu antigenul HLA variază de la o familie la alta, haplotipul incriminat fiind diferit în diferite familii. Una din metodele de calcul statistic al legăturii între haplotipurile HLA și boală este așa-numitul Lod Score.

Principalele asocieri între antigene HLA și unele boli. În tabelul 16.VII sunt induse majoritatea asocierilor descoperite între antigenele HLA și unele boli, după alelele celor 3 clase ale CMH, corelate cu frecvența la bolnavi și lotul martor și cu RR, așa cum apar în ultimele puneri la punct ale Registrului internațional din Copenhaga (1980 și 1984). Tabelul este completat cu corelările mai vechi ale antigenelor HLA-A și B, C înainte de descrierea antigenelor DR.

TABELUL 16.VII

Principalele asociații HLA-boală (17, 18)

HLA	Boala	Frecvența %		RR	Observații
		Bolnavi	Martori		
1	2	3	4	5	6
A_1	Boala Hodgkin	40	32	1,4	
A_2	Leucemie limfoblastică acută				
A_3	Hemocromatoza idiopatică	76	28	8,2	
A_{29}	„Bird Shot Retinopathy"			>1	
B_5	Boala Behçet	41	10	6,3	
	Keratoame	28	9	3,9	
B_{12}	Scleroză în plăci	18	32	0,2	(asociere negativă)
B_{14}	Deficitul de 21-hidroxilază cu exprimare tardivă	58	4		
B_{27}	Spondilită anchilozantă	90	9	87,4	
	Sindrom Reiter	79	9	37	
	Uveită anterioară acută	52	9	10,4	
	Artrite reactive (Yersinia, Chlamidia)	54	8		
B_{35}	Tiroidită subacută (De Quervain)	70	15	13,7	
B_{46}	Cancer nasofaringian	36	23	1,9	
B_{47}	Deficit congenital de 21-hidroxilază	9	1	15,4	
Cw_6	Psoriazis	87	33	13,3	asociere mai veche cu B_{13}, B_{17}, B_{37}
D/DR_1	Miastenie indusă de D-penicilamină	63	24	5,4	
D/DR_2	Scleroză în plăci	59	26	4,1	
	Nevrită optică	46	26	2,4	
	Sindromul Goodpasture	88	32	15,9	
	Răspunsul prin IgE față de alergenul Ra5	90	31	20	
	Lepra tuberculoidă				transmisă preferențial prin DR_2
	Diabetul insulinodependent	10	30	0,2	asociere negativă

(Continuarea tabelului 16.VII)

1	2	3	4	5	6
D/DR_3	Lupus eritematos sistemic	70	28	5,8	
	Boala celiacă	79	26	10,8	
	Dermatita herpetiformă	85	26	15,4	
	Deficit de IgA	81	25	13	
	Boala Addison	69	26	6,3	
	Boala Basedow	57	26	3,7	asociere mai veche cu B_8
	Tiroidita Hashimoto formă atrofică	64	24	3,2	*idem*
	Miastenie	50	28	2,5	*idem*
	Sindromul Gougerot-Sjögren	79	26	9,7	
	Glomerulonefrită extramembranoasă	75	20	12	
	Hepatita cronică activă	37	21	2,2	
	Ciroză biliară primitivă	57	15	7,6	
	Sindrom Guillain-Barré forma cronică	50	17	4,8	
	Dermatomiozita juvenilă	50	20	3,3	
	Diabet insulinodependent	56	28	3,3	
D/DR 3/4	Diabet insulinodependent	32	0	47	
D/DR_4	Diabet insulinodependent	15	32	6,4	
	Artrita reumatoidă	50	19	4,0	
	Pemfigus	87	32	7,0	
	Lupus indus de hidralazină	75	33	5,6	
	Encefalita rujeolică			>1	
D/DR_5	Tiroidita Hashimoto cu gușă	49	6	5,4	
	Anemia Biermer	25	6	5,4	
	Artrita juvenilă	50	16	5,2	
	Sarcom Kaposi	58	20	5,5	
	SIDA	75	20	12	
	Leucemie limfatică cronică	62	21	6,0	
D/DR_7	Sindromul nefrotic al copilului	33	13	3,3	
	Limfomul Burkitt	33	13	3,3	
	Boala celiacă	55	20	48	o asociere mai veche cu B_8
D/DR 1/7	Boala celiacă	34	1	60,0	
D/DR_8	Artrita juvenilă	23	7	3,6	
DQ	Lepra			>1	
DQ_2	Boala celiacă	100	72	38,5	

Această enumerare lungă nu este închisă. Creşterea constantă a polimorfismului sistemului HLA, în special al antigenelor claselor a II-a şi a III-a, introducerea tehnicilor de biologie moleculară, duce la descoperirea în continuare de noi asociaţii cu locusurile DQ, DP. Trei boli figurează de mai multe ori: *diabetul insulinodependent* (DID), *boala celiacă* şi *artrita reumatoidă juvenilă,* care se corelează cu mai multe alele DR fiecare: DR_3, DR_4 pentru DID, DR_3, DR_4, DR_7 pentru boala celiacă şi DR_5 şi DR_8 pentru artrita juvenilă. RR este maximum în cazul asocierii a două alele.

Observarea celei mai puternice asociaţii se deplasează de la un locus la altul în cursul diferitelor studii efectuate: psoriazisul a fost asociat mult timp cu antigenele B_{13} şi B_{17}, iar recent s-a identificat o asociere mai puternică cu Cw6. Afecţiunile autoimune au fost corelate cu antigenul B_8 sau cu haplotipul A_1B_8, iar în prezent se asociază cu DR_3, cele 3 antigene fiind de fapt în dezechilibru de legare, asocierea DR_3 fiind însă cea mai puternică.

În *boala celiacă (enteropatia cu sensibilitate la gluten)* 70% din bolnavi posedă antigenele HLA-B_8 şi HLA-DR_3 şi HLA-DR_7. Utilizarea tehnicii PCR a permis explorarea locusurilor DQ şi DP, evidenţiind cea mai puternică asociere a bolii cu DQ2 (90% din bolnavi sunt DQ2). S-a descris şi o frecvenţă crescută a alelelor DPB_4 şi DPB_3. Asocierea puternică cu alela HLA-DQ2 (la 90% din bolnavi) ar explica în parte RR foarte ridicat observat la heterozigoţii DR_3/DR_7 cu care acestea se află în dezechilibru de legare.

Antigenele HLA-B_{27} sunt prezente într-o serie de afecţiuni care au în comun o atingere articulară de obicei sacroiliacă, în special *spondilita anchilozantă* (25, 26, 56, 60) şi *spondilartritele seronegative postinfecţioase.* Frecvenţa antigenului HLA-B_{27} este în spondilita anchilozantă de 95% şi numai de 7% în populaţia generală. În unele artrite seronegative postinfecţioase (artrite reactive) s-a descoperit existenţa unor structuri comune între componentele germenului cauzal şi cele ale HLA. Astfel în *Klebsiella* (întâlnită în etiologia unor artrite reactive şi mult discutată în etiologia spondilitei anchilozante) s-a identificat recent o nitrogenază care are o piesă de 6 aminoacizi identică cu o secvenţă a antigenului HLA-B_{27}. La fel, *Yersinia enterocolitica,* întâlnită în etiologia unor poliartrite reactive, posedă o secvenţă aminoacidă identică şi deci o similaritate antigenică cu HLA-B_{27}.

Sindroamele autoimune se grupează în jurul a două antigene: DR_3 şi DR_5; manifestările de tip lupic sunt comune diferitelor deficite de complement.

Investigaţiile în *lupusul eritematos diseminat* (LED) au relevat două tipuri de asociaţii: prima priveşte LED familial care nu pare să fie corelat cu CMH şi a doua se referă la LED „spontan", care apare corelat cu genele codate pentru HLA-DR_2 şi DR_3; acestea totuşi nu ar fi asociate cu însăşi boala, ci mai degrabă cu expresia unor autoanticorpi particulari caracteristici bolii.

Sunt interesante asocierile haplotipului A_1 B_8 D_3 cu „eritrocităţi": A_1 cu deficitul de IgA şi DR_3 cu capacitatea mamelor $P1^{A1-}$ de a se imuniza în timpul sarcinii contra fătului $P1^{A1+}$ ducând la purpura neonatală (Reznikov-Etienant, 1986). În *sindromul Sicca* (Sjögren primar) s-a

constatat o frecvență crescută a antigenului HLA-DR_3, fenotipul obișnuit fiind A_1 B_8 DR_3. După Wilson, aproape 90% din bolnavii cu sindrom Sjögren primar și secundar posedă acest haplotip.

O corelare frecvent întâlnită este între artrita reumatoidă și antigenul HLA-DR_4. Într-un studiu pe 79 bolnavi s-a găsit o frecvență a antigenelor HLA-DR_4 de 73,6% (36% în lotul martor), care a crescut la 92% la bolnavii seropozitivi cu manifestări extraarticulare ale bolii: uveită, noduli, alveolită fibrozantă etc. (19, 29, 42). Legrand (1984) și Kohn (1988) au arătat că homozigotismul pentru HLA-DR_4 este un factor de risc major pentru *artrita reumatoidă.*

Într-un studiu pe bolnavi de origine Saudi sau arabă s-a semnalat o frecvență de 65% (față de martori 12%) a asocierii HLA-DR_4 cu *reumatismul poliarticular acut* și cu cardiopatiile reumatice.

O serie de malignități, ca *sarcon Kaposi, leucemie limfatică cronică, Mycosis fungoides, carcinom renal, leucemia cu „hairy cells"* și recent stadiul ganglionar al SIDA au ca factor de risc antigenul HLA-DR_5.

În *leucemii acute limfoblastice* și *mieloblastice* a fost raportată prezența unui exces de antigene HLA-A_2 și DR_3, precum și asocierea semnificativă a alelelor HLA-Cw3 și Cw4. Totodată, s-a demonstrat la rudele bolnavilor cu leucemie existența unui exces important de similitudine a antigenelor HLA (59).

Apariția unui marker HLA cu o frecvență crescută într-o anumită boală în toate populațiile, constituie un argument important pentru rolul său specific, în timp ce o asociere marker-boală variabilă de la o populație la alta (variație etnică) pledează pentru un rol secundar al markerului antrenat prin dezechilibru de legare cu o genă responsabilă.

Asocierea HLA-B_5 (B_{51}) cu *sindromul Behçet* este aceeași în toate populațiile. La fel asocierea HLA-B_{27} cu spondilita anchilozantă (deși riscul de îmbolnăvire variază de la o populație la alta).

În cazul DID, sensibilitatea la boală adusă de DR_4 și efectul protector al antigenului DR_2 sunt aceleași la toate populațiile. Riscul de îmbolnăvire adus de DR_3 variază, fiind nul la japonezi. Faptul că forma de diabet observată la aceștia nu se însoțește decât foarte rar de manifestări autoimune (anticorpi antiinsulari, de exemplu) ilustrează contribuția specifică a antigenului DR_3 în patogenia bolii. 90—95% din bolnavii cu DID posedă antigen DR_3 sau DR_4, în comparație cu 50% cât este frecvența acestora în populația generală. Analiza polimorfismului fragmentelor de restricție ale ADN (RFLP) a arătat o asociere cu fragmentele de restricție legate de genele DQB, mai importantă decât cea clasică cu DR_3/DR_4. Analiza secvenței lanțurilor DQB la bolnavi cu DID și la persoane sănătoase a arătat lipsa acidului aspartic din poziția 57 a lanțului DQ8β la toți subiecții bolnavi testați, față de normal, atribuindu-se acestuia un rol „protector"; substituțiile din poziția 57 pot fi recunoscute de celulele T (58). 90—96% din bolnavii cu DID sunt homozigoți aspartat negativi în comparație cu 19,5% în populația generală. Homozigoții aspartat negativi au un risc relativ de a face DID de 107.

Mecanismul rezistenței la îmbolnăvire, mediat de acidul aspartic în poziția 57 este încă neclar. Moleculele DQβ acid aspartic pozitive și-ar putea pierde capacitatea de celule T autoreactive și/sau să activeze celule T supresoare specifice unor antigene celulare.

Pe de altă parte, susceptibilitatea la boală s-ar putea corela cu capacitatea moleculelor fără (non) acid aspartic în poziția 57 de a lega și prezenta peptide responsabile de inducerea bolii (58).

Haplotipuri principale: pentru un număr de boli, testările familiale au descris câteva haplotipuri reprezentative la bolnavi față de persoanele sănătoase înrudite din aceeași familie. În tabelul 16.VI sunt trecute câteva dintre ele: 3 haplotipuri diabetice din care unul de „răspuns major", întâlnit în numeroase boli autoimune, haplotipul deficitului de C_2, al hemocromatozei, al sclerozei în plăci și al celor două forme de hiperplazie corticosuprarenală.

Frecvența lor la bolnavi este variabilă totuși, în funcție de boală și de originea etnică a bolnavilor.

Existența unor haplotipuri preferențiale pentru anumite afecțiuni ridică ipoteza fie a unor gene patogene în dezechilibru de legare cu sistemul HLA, fie a unui mecanism de sinergie între mai multe gene HLA care contribuie la susceptibilitatea la boală (tabelul 16.VI). Un exemplu pentru a doua ipoteză este faptul că produșii C_4 sunt inactivi în termeni de activitate hemolitică la subiecții B_{17} și activi la subiecții B_{37}. Acest mecanism ar putea explica genetica multor boli, ca și a DID.

Afecțiunile neurologice. Dintre aceste afecțiuni scleroza în plăci și narcolepsia se asociază cu antigene HLA.

Scleroza în plăci este asociată cu HLA-DR_2, DR_{15} aflate în dezechilibru de legare cu Dw2, DQ1. Forma progresivă se asociază cu A_5, B_7, B_{40}. Boala evoluează mai rapid în prezența DR_2, în comparație cu bolnavii negativi pentru acest antigen.

Narcolepsia prezintă cea mai puternică asociere dintre un antigen HLA și o boală. Practic afectarea provine doar la subiecți purtători ai antigenelor DR_2, DR_{15}, DQ1 — în toate populațiile studiate. Asocierea este atât de strânsă, încât cazurile de bolnavi fără DR_2 fac obiectul unui studiu internațional.

A fost descrisă și o bază genetică de predispoziție la boală legată de CMH în cazul infecțiilor cu unii helminți, trichineloză, schistosomiază, filariază etc. (31).

Recent a fost descrisă asocierea antigenului HLA-A_{29} cu o afecțiune *oftalmologică „bird shot retinopathy"* și cu unele *boli infecțioase și parazitare* (31); s-au descris asocieri pentru lepră (DR_2, DQ1), encefalita rujeolică (DR_4). Cele mai interesante observații aparțin lui Sasazuki care a studiat răspunsul organismului la antigene purificate (proteine din perete streptococic = SCw, antigen schistosomial = SJ, polen de cedru, antigen HBs).

Răspunsul organismului este variabil. Lipsa de răspuns se asociază cu Dw2, DR_2, DQ1 (pentru SCw), Dw12, DR_2 DQ1 (pentru SJ) și se găsește sub controlul limfocitelor Ts Cd_4-CD_{8+}-CD_4.

În afară de genele C_2, C_4 și BF ale căror deficite homozigote și heterozigote contribuie la o patologie polimorfă, sunt recunoscute cel puțin 3 gene care sunt cartate în zona HLA: gena hemocromatozei idiopatice, gena pentru deficitul de 21-hidroxilază (21-OH), gena responsabilă de *ataxia spinocerebeloasă*, iar recent s-au descris genele deficitului de neuraminidaze a căror localizare nu este încă precisă.

Hemocromatoza idiopatică este o tulburare recesivă strâns legată de HLA deoarece aproape toate perechile înrudite afectate sunt identice HLA. Mai mult, virtual toţi cei înrudiţi, aparent clinic sănătoşi şi HLA identici cu persoana afectată, prezintă anomaliile biochimice ale bolii. Nu se cunoaşte natura exactă a deficitului în hemocromatoza idiopatică, care să implice o absorbţie crescută de fier la nivelul intestinului; se pare că o genă care influenţează absorbţia de fier este strâns legată de sistemul HLA, în special de antigenul A_3 cu care s-ar afla în dezechilibru de legare.

Deficitul 21-OH este controlat de o genă recesivă apropiată de locusul B şi C_4. Numărul de familii cu recombinări este foarte mic; persoanele bolnave dintr-o familie sunt HLA identice. Forma congenitală severă cu pierdere de săruri a deficitului de 21-OH este asociată cu antigenul rar HLA-B_{47} şi se poate calcula că aproximativ jumătate din toate haplotipurile care poartă gena B_{47} poartă şi o genă pentru deficitul de 21-OH. Mai recent s-a constatat că o formă uşoară tardivă de deficit 21-OH este asociată cu antigenul B_{14}. Aceste două forme sunt diferenţiate de asemenea prin asocierea lor cu fragmente de restricţie ale ADN-ului, care le sunt proprii. Haplotipul cu antigenul B_{47} are o deleţie a genelor 21-OHB şi C_4B. Subiecţii B_{14} sunt purtătorii unei duplicări a genelor 21-OHB şi C_4B. Subiecţii B_8, care sunt rareori atinşi, sunt purtători ai unei deleţii a genelor 21-OHA şi C_4A.

Gena ataxiei spinocerebeloase a fost descrisă de curând ca fiind cartată în zona HLA. Ea este în dezechilibru de legare cu antigenele HLA-DR_2 şi B_7. Mecanismul bolii este necunoscut. Transmisia este dominantă.

Pentru un număr de alte boli, în care pare probabilă o legătură cu sistemul HLA, acesta este imposibil de considerat ca mod de transmitere.

Pentru DID analizele genetice au eliminat atât un model dominant cât şi recesiv pentru a reţine un model „intermediar" cu cel puţin 2 locusuri în regiunea HLA. De fapt excesul de heterozigoţi DR_3/DR_4 şi excesul de diabetici HLA identici constituie date care aparent nu se împacă cu un model monogenic (28).

Lucrări recente de biologie moleculară arată implicarea alelei DQ $B_3.2$ în susceptibilitatea la DID. Această alelă asociată cu DR_4 se întâlneşte la 70% din bolnavii cu DID, apărând ca alela cea mai puternic asociată cu boala. Analiza secvenţelor lanţurilor DQB la un număr mare de bolnavi, ca şi la persoane sănătoase, a evidenţiat importanţa poziţiei 57 din lanţul DQB, la bolnavii cu DID. Lipsa acidului aspartic în poziţia 57 pare corelat cu susceptibilitatea de a dezvolta boala.

Un efect „protector" a fost atribuit asociaţiilor negative: $RR<1$. Dacă o alelă este predominantă la un bolnav, frecvenţa altor alele este diminuată. Se cunosc câteva situaţii asociate semnificativ cu $RR<1$: DR_2 cu DID (absent la majoritatea bolnavilor); B_8 (sau haplotipul A_1 B_8 Dr_3) cu frecvenţă scăzută în deficitul congenital de 21—OH; riscul de scleroză în plăci mult diminuat la persoanele purtătoare ale antigenului B12.

Studii recente indică efectul protector al antigenelor HLA-DP în artrita reumatoidă; în cazul asocierii bolii antigenul HLA-DR_4 prezenţa antigenului DP_{w1} asigură un efect protector, în timp ce în absenţa

antigenului DR_4 acest efect este dat de antigenul DP_{w3} (45). Un efect similar a fost citat în boala Hodgkin (5).

În studiul HLA-boli o importanță deosebită o au familiile informative în care există un exces semnificativ de frați atinși de boală, care sunt HLA identici. Este cazul bolii Hodgkin, LAL, mielomului, unde s-a sugerat o predispoziție genetică pentru boală.

Asocierea dintre antigenele HLA și unele boli poate servi și ca element diagnostic în boli ca spondilita anchilozantă ($HLA\text{-}B_{27}$), sindromul Behçet ($HLA\text{-}B_5$), hemocromatoza idiopatică ($HLA\text{-}A_3$), deficiența de 21-OH ($HLA\text{-}B_{47}$), în care antigenul implicat se găsește cu frecvență crescută în raport cu populația normală.

Determinarea $HLA\text{-}B_{27}$ este indicată în forme de SA cu debut periferic, atipic, cu semne clinice incomplete, fără semne radiologice. Testarea se face cu minimum patru seruri monospecifice.

Cercetarea homozigotismului pentru gena hemocromatozei se face prin tipizarea HLA la întreaga familie și compararea segregării haplotipurilor părinților la bolnav și la ceilalți copii.

Deficitul de 21-OH se poate diagnostica prenatal prin amniocenteză și decelarea markerilor HLA (B_{47}, C_4AQ0, C_4BQ0).

Există și unele relații între evoluția și severitatea unor boli și asocierea cu unele antigene HLA. DID evoluează mai sever la bolnavii DR_3 pozitivi; boala Hodgkin are o evoluție favorabilă în prezența antigenului B_8; în leucemia limfoblastică acută (LLA) prezența $HLA\text{-}A_9$ ar avea un prognostic favorabil, fiind asociată cu remisiuni de mai lungă durată, iar haplotipurile $HLA\text{-}A_2$, B_{12} și A_2, B_{40} ar fi asociate cu o supraviețuire mai lungă, ca de altfel și prezența $HLA\text{-}B_{12}$ și $HLA\text{-}B_8$ în leucemia mieloblastică acută.

Instalarea unui tratament precoce în SA detectată timpuriu cu ajutorul testării HLA permite diminuarea agravării leziunilor și are efect preventiv în hemocromatoză, în care frații HLA identici trebuie tratați prin sângerări preventive, frații semiidentici trebuie supravegheați medical, iar frații HLA diferiți sunt excluși din risc.

La fel, este utilă depistarea subiecților cu risc crescut de complicații renale după tratament cu săruri de aur (DR_3+).

Există și un interes nosologic, prin gruparea în același sindrom a unor afecțiuni până atunci disparate (încadrarea porfiriei cutanate în hemocromatoză) sau invers (excluderea din cadrul DID legat de HLA a sindromului Wolfram).

Mecanisme. Dat fiind marea varietate a afecțiunilor care se asociază cu antigenele HLA este imposibil ca un singur mecanism să fie implicat în producerea lor. În cele mai multe cazuri nu se cunoaște exact mecanismul prin care sistemul HLA conferă susceptibilitatea la boală. Excepție fac câteva boli, ca deficitul de complement (C_2, C_4, BF), hemocromatoza idiopatică, hiperplazia corticosuprarenală și ataxia spinocerebeloasă, ale căror gene se cartează în imediata vecinătate a sistemului HLA (gene găzduite).

Pentru restul afecțiunilor câteva ipoteze caută să explice mecanismele de bază care ar putea fi responsabile de asocierea și legătura HLA cu anumite boli. Ele pornesc de la cunoașterea funcțiilor CMH.

A. *Implicarea moleculelor de clasa I.* Acestea sunt ubicuitare şi implicate în cunoaşterea non-selfului. Alterarea lor printr-un agent patogen poate duce la veritabile reacţii de respingere, cu preţul unei lizetisulare.

(1) *Teoria selfului alterat* (molecule de clasa I modificate) nu este decât proiecţia mecanismului de dublă restricţie specifică, care duce la liza celulelor ţintă infectate cu virus de către limfocitele T citotoxice; restricţia limfocitelor pentru virusul care infectează celula-ţintă şi restricţie pentru antigenele de clasa I care trebuie să fie comune efectorului şi ţintei. Descris iniţial pentru coriomeningita murină, acest mecanism s-a extins şi la alte tipuri de infecţii virale la animale (restrictive totdeauna pentru antigenele de clasa I) şi ulterior şi la om (pentru celule modificate de haptene, antigene minore de histocompatibilitate, numeroase virusuri).

De obicei, reacţia de liză este destul de eficientă pentru a antrena vindecarea, dar uneori fenomenele autoagresive duc la leziuni grave.

Această teorie ar putea explica natura asocierii antigenelor de clasa I cu unele boli: boala Behçet (HLA-B_5), pentru care se presupune o etiologie virotică, tiroidita subacută (HLA-B_{35}) în care a fost izolat un virus (şi unde se consideră că antigenul HLA are rol de loc receptor pentru virus). Spondilita anchilozantă (HLA-B_{27}) este boala în care s-a obiectivat pentru prima oară un determinant prezent pe limfocitele B_{27}, în reacţie încrucişată cu antigenele din *Klebsiella.* Determinantul este absent la persoanele sănătoase B_{27} pozitive înrudite cu bolnavul, dar poate fi indus prin incubarea limfocitelor lor cu lizate de *Klebsiella.* De fapt este vorba de o plasmidă, care induce un „B_{27} modificat" la suprafaţa celulei B_{27}. Modelul de spondilită anchilozată este apropiat de cel al „selfului" alterat", deşi încă nu au fost izolate şi studiate clonele citotoxice.

(2) *Mimicria moleculară.* Existenţa unor reacţii încrucişate între unele antigene HLA şi unele antigene ale unor microorganisme responsabile de boală nu duc la recunoaşterea ca „non-self" a determinanţilor antigenici ai microorganismelor „invadante", datorită asemănării lor antigenice cu antigenele HLA. Astfel în *Klebsiella* care a fost discutată în etiologia spondilitei ankilopoietice, a fost pusă în evidenţă o nitrogenază care posedă o secvenţă de 6 aminoacizi identică cu o secvenţă din antigenul HLA-B_{27}. La fel şi *Yersinia enterocolitica* şi salmonelele, factori etiologici pentru unele artrite reactive (spondiloartrite negative cu HLA-B_{27}) ce apar la persoane cu fenotip HLA-B_{27} au o secvenţă aminoacidică identică (şi deci o identitate antigenică) cu o secvenţă aminoacidică din antigenul HLA-B_{27}. Un argument ce pledează în favoarea acestor legături este dat de următoarea observaţie: o navă de război a ancorat într-un port, dar numai ofiţerii au avut permisiunea să părăsească vasul, iar restul echipajului a fost servit pentru „consolare" cu un bufet rece; unul din alimentele servite a fost infectat cu salmonele şi toţi marinarii au făcut salmoneloză. O parte din aceştia au prezentat şi inflamaţii articulare, or toţi aceştia erau HLA-B_{27} pozitivi. În plus, se dezvoltă un fenomen de toleranţă care nu duce la mecanismul „triggering" între celulele T şi B, necesar reacţiei imune de tip celular şi umoral; această ipoteză, propusă de Snell, susţine că anumite antigene HLA (la om)

și H-2 (la șoarece), precum și antigenele CREG (*Cross-Reactive Group*), înrudite structural cu ele, posedă o structură moleculară similară cu unele antigene patogene care fac ca organismul să nu poată recunoaște corect o structură străină (non-self) și în acest caz, răspunsul imun lipsind, se ajunge la lezarea celulară. Pe aceeași linie Clark a arătat asemănarea existentă între antigenele de clasa I și antigenele care constituie învelișul virusului leucemiei T umane.

(3) O altă implicare a moleculelor de clasa I este aceea de elemente de receptor hormonal, așa cum s-a descris recent pentru insulină, sau de receptor pentru agenți etiologici.

B. *Anomalii de răspuns imun.* În cadrul corelării HLA cu unele boli, s-a studiat răspunsul imun la produse patogene (toxina tetanică), extrase de membrană streptococică etc.

Experiențe în culturi cu antigen-macrofag-limfocit T au permis să se arate că răspunsul limfocitelor T depinde de monocitele care prezintă antigenul. Acest răspuns este restrictiv la cel puțin un haplotip comun între celulele care prezintă antigenul și celulele efectoare. La baza acestei restricții se află moleculele de clasa a II-a.

Numeroase observații au arătat că intensitatea răspunsului imun poate fi corelată cu antigenele sistemului HLA. Astfel, antigenul HLA-DR_3 (sau haplotipul A_1 B_8 DR_3) este amplificator al răspunsului imun fiind implicat în unele boli autoimune, în persistența îndelungată a anticorpilor anti-insule Langerhans în DID, în răspunsul celular amplificat la antigene bacteriene, în protecția contra tumorilor maligne etc.

Kelly (1985) arată că susceptibilitatea pentru DID este mai mare pentru haplotipul desfășurat decât pentru o alelă izolată (interacțiuni în CIS).

Se cunoaște, de asemenea, susceptibilitatea mai mare la boală în cazul asocierii unor alele de pe doi cromozomi, de exemplu: DID și DR_3/DR_4, boala celiacă și DR_3/DR_7, probabil legat de formarea posibilă a unor molecule hibride. Tot asociat cu boli autoimune este și antigenul HLA-B_8.

În schimb, antigenul HLA-DR_2 este supresor al răspunsului imun. Astfel, haplotipul A_3 B_7 DR_2 este legat de un răspuns slab la anatoxina tetanică și alte toxine bacteriene. De asemenea, un răspuns imun deprimat, legat de DR_2, a fost descris și în lepră.

Prezentarea antigenului constituie un element esențial în răspunsul imun. În boala celiacă s-a observat o scădere a reactivității limfocitelor T, atât la bolnavii în remisiune, cât și la subiecții normali, față de antigenele de gluten în culturi celulare, când monocitele care prezentau Atg. erau DR_3 sau DR_7 pozitive (antigene în asociere cu boala).

C. *Gene care controlează complementul (C_2 C_4 BF).* Alelele deficitare nu sunt rare, au o frecvență variabilă: pentru C_2 Q0=1%, C_4 AQ0=4%, pentru C_4 BQ0=18%. În doză homozigotă sunt responsabile de sindroame lupice.

Alterarea factorilor complementului predispune la formarea de complexe imune, pierderea puterii hemolitice (mai ales pentru C_4BQ0), cu scăderea capacității de liză a învelișului virusurilor și de neutralizare a lor, cu creșterea permeabilității vasculare, toate alterări de răspuns imun celular și umoral. Aceste deficite explică o parte din simptoma-

tologia afecțiunilor autoimune cu C_4 AQ0 (lupus, hepatita cronică activă) sau cu C_4 BQ0 (DID).

D. *Ipoteze pentru trei situații patologice:* a) boli prin mecanism autoimun; b) proliferare malignă; c) patologia infecțioasă.

(1) *Autoimunitatea.* Bolile prin mecanism autoimun reprezintă peste jumătate din afecțiunile asociate cu antigenele HLA. Deși la o mare parte dintre ele se întâlnește antigenul DR_3 sau haplotipul de răspuns imun A_1 B_8 DR_3, patogenia lor nu poate fi explicată printr-un singur mecanism.

În tiroidita autoimună intervine în asociere DR_3 și DR_5; o formă de DID se asociază cu BFF_1. *Clearance*-ul complexelor imune este controlat și de moleculele C_4. Analiza familiilor cu DID arată că genele care controlează producerea de anticorpi antiinsulari nu sunt situate exclusiv în regiunea HLA.

Expresia anormală a moleculelor de clasa a II-a ar putea favoriza sau iniția procese de autoimunitate. Battazo, observând cantități neașteptat de mari de molecule DR la nivelul tiroidei, la bolnavii cu boală Basedow, consideră anomalia ca o consecință a unei infecții virale urmată de producerea de interferon ca o etapă crucială pentru prezentarea de autoantigene în cantitate nemăsurată, suficiente pentru a stimula limfocitele T autologe.

Acest mecanism se aplică și la DID: celulele Langerhans în stare normală nu exprimă molecule de clasa a II-a, și prezența anormală a acestora ar putea fi indusă de un virus presupus a fi la originea bolii.

Recent s-a observat că limfocitele diabeticilor conțin frecvent genomul CMV, spre deosebire de subiecții normali.

Efectul favorabil al ciclosporinei s-ar datora inhibării inducției anormale de molecule de clasa a II-a prin interferon.

Legat de autoimunitate, Charon și colab. (1987) au descris molecule hibride prin asocierea lanțurilor alfa și beta a diferitelor molecule de clasa a II-a. Cele mai frecvente combinații sunt DR alfa/DR beta. Aplicând acest concept la autoimunitate, Charon arată că un autoantigen ipotetic se poate prezenta cu o accesibilitate mai mare datorită moleculelor hibride. Un exemplu îl constituie DID unde combinațiile hibride DR_3/DR_4 sunt mai mult în concordanță cu boala decât la subiecții DR_3/X sau DR_4/X.

În *pemphigus vulgaris* (PV), afecțiune cutanată autoimună severă, potențial fatală, mediată de autoanticorpi specifici pentru un antigen epidermic care duc la pierderea adeziunii celulare, s-a găsit o frecvență crescută a antigenului DR_4 (la evreii Ashkenazi) și a antigenelor DR_4 și DR_6 la evreii neashkenazi.

Analiza secvenței nucleotidelor genelor DQβ a evidențiat o alelă rară la bolnavii DR_6 prezentă la 100% din bolnavi. Frecvența mică a acestei alele în populația sănătoasă (<7%) o face un marker valoros al bolii. Această alelă rară este identică în secvența de aa a lanțului DQβ neasociat cu pemfigus, cu excepția reziduului 57.

Astfel în PV ca și în DID, modificările DQβ 57 au un efect dramatic asupra susceptibilității la boală.

(2) *Proliferarea malignă.* În modelul murin, genele de răspuns imun din regiunea H-2 conferă o rezistență la o serie de tumori sau la leu-

cemii induse. Răspunsul celular față de virusurile oncogene este restrictiv pentru antigenele de clasa I. La om, asocierea a fost confirmată pentru alelele claselor I și a II-a.

Studii familiale au arătat un exces de A_2-B_{12} în familiile cu mai mulți bolnavi cu malignități (46).

În boala Hodgkin s-a găsit un exces de frați care erau HLA identici cu bolnavii.

În melanomul malign familial segregarea trăsăturii se produce dominant, în legătură posibilă cu HLA (69). În limfoame maligne, la populații orientale, este citată asocierea frecventă a bolii cu antigenele HLA-B_{16}.

Ipoteza unui mecanism recesiv a fost propusă pentru a explica excesul de antigene în comun la părinții copiilor leucemici. Pentru a explica aceste observații, genele de răspuns imun nu sunt singurele mecanisme posibile, pot participa și defecte de reparare a ADN, rolul AMP ciclic, dereglarea antigenelor de histocompatibilitate. În numeroase afecțiuni maligne este descrisă pierderea expresiei antigenelor de suprafață cu apariția de antigene „străine".

Câteva antigene, ca A_{11} B_{15} B_{17}, sunt întâlnite frecvent ca extrareacții. Nu se știe însă dacă aceste antigene sunt cauza sau efectul malignității. Metastazele se asociază de multe ori cu pierderea exprimării moleculelor de clasa I, legate de o absență de „homing" (23, 24), explicând astfel migrarea celulelor maligne și scăparea lor de liză.

(3) *Patologia infecțioasă.* Sunt rare observațiile privind asocierea antigenelor HLA cu sensibilitatea sau rezistența la agenți infecțioși sau parazitari; explicația constă în multitudinea determinanților antigenici purtați de germeni și în caracterul poligenic al răspunsului (67).

E. *Rolul altor sisteme genetice.* Sexul masculin este marker genetic important pentru SA și cel feminin în LED; alotipurile Gma și g au fost observate în exces (împreună cu DR_3) în maistenie, tiroidita Hashimoto și boala Basedow; acetilarea medicamentelor cu structură aromatică (N-acetiltransferaza al cărui fenotip „lent" este responsabil de lupusul indus la hidralazină, în legătură cu DR_4).

F. *Un alt mecanism* care încearcă să explice asocierea antigenelor HLA cu diferite boli privește existența unor gene de susceptibilitate la boală, gene aflate în dezechilibru de legare cu antigenele HLA, frecvent întâlnite în numeroase boli (de exemplu: B_{27}, DR_3, DR_4 etc.). Susceptibilitatea la boală se transmite ca o trăsătură autosomală dominantă. Nu se poate explica de ce boala, expresie fenotipică, se dezvoltă numai la o minoritate din cei ce poartă „alela de susceptibilitate".

Concluzii. Sistemul HLA, componentă principală a Complexului Major de Histocompatibilitate, reprezintă cel mai amplu sistem genetic al omului și are implicații funcționale multiple. El este un adevărat „centru de comandă al organismului", cartea sa de identitate care permite menținerea identității biologice a unui individ, prin recunoașterea a ceea ce este propriu (self) față de străin (non self) prin implicațiile în procesele imunitare celulare și umorale.

Un progres esențial pentru înțelegerea mecanismelor imunologice l-a constituit descoperirea fenomenului de restricție a răspunsului imun,

care a demonstrat clar că non self-ul nu poate fi recunoscut ca străin decât în contextul self-ului.

Guvernat de perechea a șasea de cromosomi somatici, sistemul HLA prezintă un polimorfism deosebit la nivelul celor trei clase de antigene ale sale. Antigenele de clasa I se găsesc pe toate celulele, antigenele de clasa a II-a se găsesc pe celulele sistemului imun și antigenele de clasa a III-a sunt produse serice, unele fiind asociate cu sistemul complementului. Fiecare din genele sistemului are mai multe alele, iar ansamblul tuturor acestor alele formează haplotipul.

Descrise inițial ca antigene leucocitare prin asemănarea cu antigenele de grup sanguin, antigenele HLA au fost rapid asimilate cu antigenele de transplantare, asigurarea histocompatibilității fiind o condiție esențială a reușitei grefelor de organe și țesuturi.

Studiile privind aceste antigene au deschis câmpuri noi de cercetare, cu aplicabilitate în clinică.

Prin cele mai interesante cercetări care s-au dezvoltat ca o consecință indirectă a transplantului de organe și țesuturi, este și asocierea unora dintre antigenele de histocompatibilitate cu o varietate de boli, fapt ce a permis descifrarea patogeniei unor boli, pentru altele, s-au putut emite ipoteze legate de funcțiile CMH, care să explice modul lor de producere. Asocierea HLA-boala este probabil o manifestare a funcției de bază de discriminare a self-ului și de reglare a răspunsului imun.

Exprimarea antigenelor HLA încă din viața fetală, păstrarea lor neschimbată de-a lungul vieții, ca și modul lor de transmitere la descendenți permit ca sistemul HLA să fie utilizat în medicina legală la stabilirea paternității.

De asemenea, sistemul HLA se pretează la studii antropologice și populaționale, unii markeri HLA fiind caracteristici anumitor rase și grupuri de populații.

Regiunea HLA a complexului major de histocompatibilitate demonstrează un exemplu fascinant de regiune genetică complexă, cu o mare varietate de funcții biologice care au implicații majore la nivel clinic. Acest CMH rămâne încă un câmp vast de cercetare, care va deschide probabil o pagină în biologia și patologia umană.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. AMALDI I.: J. Immunol. 1989; 142: 999.
2. ANASETTI C. și colab.: New Engl. J. Med. 1989; 320: 197.
3. BACH F. H., REINSMOEN N., SEGALL M.: Transplant Proc. 1983; 15: 102.
4. BARRETT A. J. și colab.: Bone Marrow Transplantation. A Review Oxford Publishing Foundation, 1988, 1.
5. BODMER J. G.: Lancet 1989; 24: 1455.
6. BEATY P. G., CLIFT R. A., MIKELSON E. M., NISPEROS B. N.: New Engl. J. Med. 1985; 313: 766.
7. BERCEANU ȘT., PĂUNESCU E.: Biologia și patologia imunității. Edit. Acad. Române, București, 1981.
8. BIGNON J. D. și colab.: Immunologie Leuco-plaquettaire II. Edit. CRTS Nantes, 1990, 25.
9. BLAJCHMAN M. A., KING D. J., HEDDLE N. M., SINGAL D. P., WALKER I. R.: Amer. J. Med. 1985; 79: 143.
10. BODMER J., BODMER W.: Immunology Today 1984; 5: 251.

11. BONNEVILLE F. și colab.: Le typage HLA DR-DQ par technique „EFLP". Edit. CRTS, Nantes, 1990, 1.
12. BOROWSKY R.: Amer. J. Hum. genet. 1988; 42: 132.
13. BRUCE M. H., DUGGIN G. G., PHILIPS J., BISHOP G. A., HORWATH J. S., TILLER D. J.: Lancet 1984; 1: 247.
14. BURNETT A. K., McDONALD G. A.: În: Clinical Transplantation, MTP Press, 1987, 171.
14a. CHAPEL HELEN, MANSEL HAENEY: Clinical Immunology, Sc. Ed. Blackwell. Sc. Publ., 1988.
15. COLIȚĂ D.: Introducere în imunologie. Edit. Medicală, București, 1993.
16. CESBRON ANNE: HLA et greffe de moelle, Ed. CNTS, Nantes, 1993, UV 8, 1.
17. DAUSSET J., MARICA P. L. A.: HLA — complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme. Edit. Flammarion, Paris, 1989.
18. DEGOS L.: Le CMH de l'homme. Le système HLA. În „Hématologie". Edit. Méd. Science, Flammarion, Paris, 1992, 187.
19. GERALD T. N.: Arthritis. Rheum, 1989; 32: 15.
20. GOUDEMAN N., SALMON C. H.: Immunohématologie et immunogénétique. Edit. Flammarion, Paris, 1980.
21. GALEA G., URBANIAK S. J.: În Clinical Transplantation current practice and future prospects. Edit. MTP Press Ltd., 1987, 57.
22. GREEN C.: În Recent Progress in organs Transplantation. Published by The Medicine Group (UK) Ltd., 1988, 1.
23. HALLE, HORS J., KAPLAN C.: În: Immunologie Leuco-Plaquettaire, Ed. CNTS, 1993, 138.
24. HORS J.: În: Immunologie Leuco-Plaquettaire. Ed. CNTS, 1993, 189.
25. ILINCA DOINA: Bul. Acad. Șt. Med. 1984; 4: 113.
26. ILINCA DOINA: Actualități în Medicina Internă. Edit. Medicală, București, 1988.
27. IRLÉ C.: Méd. Hyg. (Genève) 1987; 45: 3176.
28. IWATANI J.: J. Clin. Endocr. Metab. 1986; 63: 695.
29. JARA Q.: Ann. Rheum. Dis. 1986; 45: 627.
30. JORGENSEN D. W., McFARLAND J. G., HILLMAN R. S., SLICHTER S. J.: Transfusion 1984; 24: 292.
30a. KELLY A.: Trowsdale. Int. Arch. Allergy Immunol. 1994; 103: 11.
31. KONO D. H. și colab.: În: Immune recognition and evasion: molecular aspects of host parasite interaction. Acad. Press, 1990, 53.
32. LITMAN B. H.: J. Immunol. 1989; 142: 520.
33. LOMBARDI G.: J. Immunol. 1989; 142: 753.
34. LUPU F. și colab.: Tissue Antigens 1992; 39: 23.
35. MALE D.: În: Immunology, Gower Medical Publishing, Londra, New York, 1986, 41, 44.
36. McDEVIT H. O. și colab.: New Engl. J. Med. 1980; 25: 1541.
37. McMASTER P., KIRBY R. M., GUNSON B. K.: În: Clinical Transplantation. MTP Press, 1987, 199.
38. MORARU I.: Imunologie. Edit. Medicală, București, 1983.
39. MULLER J. Y.: Rôle du CMH dans la réponse immune, Ed. CNTS, 1992, 1.
40. MÜLLER E. C.: HLA-DR Antigene und T-Lymphozyten subpopulationen. Disertation zum erwerb des Doktogrades der Med., 1992.
41. MYRVIK Q. M., WEISER R. S.: În: Lea J. și Febiger H. (eds.): Fundamentals of Immunology. Ed. Down, Philadelphia, 1984.
42. OISSU N. Y.: Amer. J. Med. 1984; 84: 257.
43. OPLEZ G., MICKEY M. R., TERASAKY P.: Transpl. Proc. 1981; 13: 136.
44. PALMER A.: Lancet 1989; 1: 10.
45. PAWELEC G., REEKERS P., BRACKERTZ D., DANSOM D., SCHNEIDER E. M.: Tissue Antigens 1983; 31: 83.
46. PELLEGRIS G., ILLENI M. T., ROVONI D., VAGLINI M., CASCINELLI N.: Int. J. Cancer 1982; 28: 621.
47. POPESCU A. G., ANTOHI ȘT.: Rev. Sanit. Milit. 1978; 1: 11.
48. PETER W. și colab.: New Engl. J. Med. 1990; 11: 733.
49. REED E.: New Engl. J. Med. 1987; 23: 1450.
50. REED E. și colab.: În: HLA. Oxford University Press, vol. 2, 1991.

51. REED E. şi colab.: Population and family studies of HLA-DR4 by use of oligonucleotid typage. Tissue Antigens 1992; 39: 266.
52. REED E.: Polymorphism of HLA in the Romanien population. Antigens 1992; 39: 8.
53. REYNOLDS G.: Med. Lab. Sci. 1988; 45: 113.
54. RODEY G. E.: The lymphocyte. Ed. Liss Inc., New York, 1981.
55. RUSSEL S. şi colab.: L. New Engl. J. Med. 1990; 21: 1505.
56. SASAZUKI T.: J. Human Genet. 1982; 27: 81.
57. SAVEUSE H. şi colab.: Presse méd. 1988; 17: 698.
58. SIHA A. A., McDEVITT H. O.: În: Immune recognition and evasion: molecular aspects of host-parasite interaction. Acad. Press, 1990, 39.
59. TANAKA K., OKOKI K.: Tissue Antigens 1984; 23: 81.
60. TEYTON L., CHARRON D.: Rhumatologie 1988; 40: 91.
61. THOMSON A. W., SEWELL H. F.: În: Clinical Transplantation. MTP Press, 1987, 125.
62. TORPEY D. J.: J. Immunol. 1989; 142: 1325.
63. TRESTIOREANU AL., BĂLĂNESCU E. şi colab.: Oncologia 1983; 22: 1.
64. VAN DER POEL J. J.: În: HLA antigens as immune modulators a model study nosing HLA-A2 types, IGP. Printing PV Dordrecht, 1991.
65. VANDHEIM M. C.: New Engl. J. Med. 1986; 315: 1314.
66. WHO HLA Nomenclature Committee. Vox Sang 1985; 42: 49.
67. WAKELIN D.: În: Immune recognition and evasion, molecular aspects of host-parasite interaction. Acad. Press, 1990, 61.
68. WILEY D., STROMINGER J.: Nature (London) 1987; 329: 590.
69. XU X. P., ZHENG C. Y., WANG C. Y., LI Q. H.: Immunol. Invest. 1986; 15: 55.
70. POPESCU MUT DELIA: Hematologie clinică, Edit. Medicală, Bucureşti, 1994, 264.
71. * * * Standards for Histocompatibility testing 1992; 1.
72. * * * Arthritis über den Magen-Darm Trakt. Selecta 1988; 4: 196.

XVII

ELEMENTE DE GENETICĂ MOLECULARĂ

DAN COLIȚA

NOȚIUNI INTRODUCTIVE

În 1866 Gregor Mendel a emis teoria existenței unor *factori ereditari* care determină dezvoltarea caracterelor organismelor și, în plus, asigură transmiterea acestor caractere de la o generație la alta printr-un mecanism unic pentru toată lumea vie. Cinci decenii mai târziu, Wilhelm Johannsen înlocuiește termenul de „factor ereditar" cu cel de genă („genos" — în greceşte = urmaș) (28) pe care o definește ca unitatea funcțională a eredității. Totalitatea genelor unui organism (constituția sa genetică sau ereditară) formează „genotipul", iar ansamblul caracterelor fizice, fiziologice și comportamentale prin care se exprimă zestrea sa genetică, formează „fenotipul". (Genotipul determină fenotipul sau, altfel spus, o genă determină un caracter somatic.) În 1910, Thomas H. Morgan și școala sa elaborează „teoria cromosomială a eredității" care, ulterior, va fi completată cu alte concepte fundamentale. El a demonstrat că genele sunt plasate în cromosomi („corpii colorabili", descrişi succesiv până la 1880 de Flemming, Balbiani și Waldeyer) (28). Genele sunt înșiruite linear pe cromosomi și ocupă fiecare poziții relativ fixe denumite „loci". Genele se comportă ca unități individuale și constante (rămân nealterate în urma încrucișărilor). Ca unități de transmitere genetică, genele se pot transmite independent (conform celei de-a 2-a legi a lui Mendel) sau înlănțuite („linked"), iar fenomenul de linkage se manifestă numai în cazul genelor plasate în același cromosom. În nucleul celular somatic cromosomii se găsesc sub formă de perechi. Membrii unei perechi de cromosomi (și genele componente) provin, fiecare, de la un părinte diferit (copiii sunt semiidentici cu părinții lor). Genele care ocupă locii omologi ai cromosomilor unei perechi sunt denumite *alele*. Ele îndeplinesc aceeași funcție (comandă, de exemplu, sinteza unei enzime) fără ca, în mod necesar, să fie identice din punct de vedere molecular. Variațiile alelelor (allelon — în greceşte = „din-

tr-una în alta") (28) apar în urma mutațiilor și uneori pot realiza un alelism mltiplu (de exemplu, pentru locusul B al complexului major de histocompatibilitate s-au identificat 47 de alele). Spre deosebire de celulele somatice, care sunt diploide (cu număr dublu de cromosomi), celulele reproductive masculine și feminine (gameții) sunt haploide (posedă un singur set de cromosomi). Reducerea la jumătate a numărului de cromosomi în gametogeneză, se produce în cursul meiozei (modelul special de diviziune al acestor celule). În plus, într-un anumit moment al meiozei, care precede reducția cromosomială, cromosomii unei perechi (unul provenit de la mamă și celălalt de la tată) se alătură de așa manieră încât locii lor omologi devin suprapuși. Între cromosomii astfel înlănțuiți se produc schimburi reciproce de material genetic, în esență o recombinare de gene care nu schimbă însă și cantitatea globală în material genetic a celor 2 cromosomi (fenomenul de *crossing over).* Fenomenul de *crossing over* are 2 consecințe: alăturarea pe un cromoson a unor gene provenite de la un părinte cu altele provenite de la celălalt părinte și crearea de noi combinații genetice prin ruperea grupurilor de linkage. După fuzionarea gameților haploizi se formează un ou (zigot) care este din nou o celulă diploidă. În funcție de zestrea genetică a celulelor haploide care contribuie la formarea oului, cele 2 alele ale cromosomilor omologi pot fi *identice* (și atunci individul este homozigot pentru locusul respectiv) sau *diferite* (situație în care individul este heterozigot pentru locusul respectiv).

În 1944, Oswald T. Avery, C. M. Macleod și M. J. McCarthy au dovedit că purtătorul informației ereditare este acidul dezoxiribonucleic (ADN). Prin aceasta genetica dobândește noi valențe. Ea devine studiul moleculelor eredității. Gena, care este unitatea de stocare a informației genetice (informație care se exprimă prin fenotip și se transmite urmașilor), este de fapt un fragment de ADN. Din punct de vedere chimic, molecula de ADN este o înșiruire de nucleotide (nucleobaze). Un nucleotid este constituit din 3 molecule componente: un grup fosfat+ +dezoxiriboză+bază azotată. Elementul central al acestei triplete este dezoxiriboza care atașează molecula de bază azotată la carbonul 1′ și grupul fosfat la carbonul 5′ (fig. XVII.1). Asocierea lineară a nucleotidelor (formarea moleculei de ADN) este mijlocită de grupările fosfat care formează legături diesterice între carbonul 3′ al pentozei unui nucleotid cu carbonul 5′ al pentozei nucleotidului următor. Această înșiruire creează „polaritatea" moleculei de ADN căreia i se recunoaște „în amonte" o extremitate 5′ și „în aval" o extremitate 3′ (fig. XVII.2). Bazele azotate din constituția ADN sunt de 2 tipuri: *baze pirimidinice* (citozina și timina) cu structură hexagonală simplă și baze *purinice* (adenina și guanina), heterocicluri mai complexe formate dintr-un inel hexagonal cuplat cu unul pentagonal. Lungimea moleculei de ADN este evaluată după numărul de nucleobaze (sau de baze). Unitatea de măsură este kilobaza (kb) care cuprinde 1 000 de nucleotide. Nucleotidele reprezintă suportul material al informației biologice (zestrea genetică.) Cele 4 baze alcătuiesc alfabetul genetic. O tripletă de baze succesive formează o unitate de interpretare (un codon), iar cele 4^3 combinații posibile formează codul genetic.

În 1953, James D. Watson, Francis Crick și M. Wilkins au demonstrat că macromolecula de ADN este formată din 2 lanțuri polinucleotidice paralele, înfășurate helicoidal în jurul unui ax comun. Cele 2 lanțuri polinucleotidice sunt dispuse „antiparalel" (cu polaritatea contrară): o catenă este orientată 5′→3′ iar catena parteneră este orientată 3′→5. Unitatea catenelor între ele este mijlocită de legăturile hidrogen care se stabilesc între bazele azotate ale nucleotidelor care vin față în

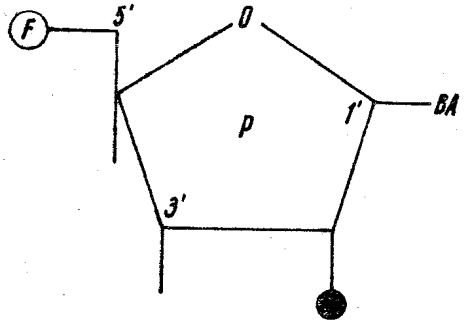


Fig. XVII.1. — Elementele componente ale unui nucleotid: P=pentoza; F=gruparea fosfat; BA=baza azotată. ● =H în cazul ADN sau OH în cazul ARN).

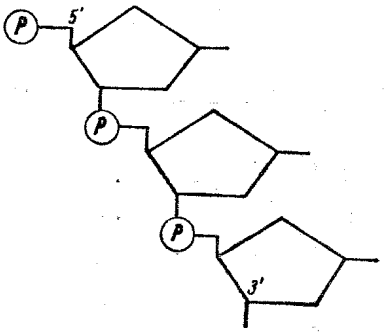


Fig. XVII.2. — Reprezentare schematică a unui fragment de moleculă de ADN (5′—3′: polaritatea moleculei).

față. Condițiile stereochimice obligă împerecherea unei purine cu o pirimidină, iar perechile obligatorii sunt adenina cu timina (A—T) și guanina cu citozina (G—C) (legea Watson-Crick a complementarității bazelor) (fig. XVII.3). Structura ADN-ului seamănă cu o scară în spirală în care fiecare treaptă este formată dintr-o pereche de baze complementare.

Dispoziția ADN-ului în cromosomi. Fiecare cromosom este format dintr-o moleculă de ADN (1, 19). Lungimea acestor molecule diferă de la un cromosom la altul. Puse cap la cap, moleculele de ADN din toți cromosomii unei celule somatice umane ar măsura circa 174 cm. Această masă imensă de nucleotide este îngrămădită în nucleii celulari care au un diametru mediu de numai 5×10^{-4} cm, ceea ce înseamnă o condensare cu un ordin de mărire de aproximativ 10 000 ori. Cel puțin 4 fenomene înlănțuite contribuie la această condensare a panglicii ADN-ului: 1) *înfășurarea pe histonele nucleosomale* (grupuri octamerice de histone peste care se înfășoară 146 nucleotide, formează unitatea structurală fundamentală a cromosomului — nucleosomul; porțiunea ADN-ului dintre 2 nucleosomi succesivi, de aproximativ 60 de nucleotide, este denumită „linker"); 2) *împachetarea a 6—7 nucleosomi* cu formarea unor teancuri (este mediată de o specie aparte de histone nonnucleosomale; această înșiruire de nucleosomi condensați apare la microscopul electronic sub forma unei fibre de 30 nm); 3) *plicaturarea fibrei* sub formă de bucle (sau domenii) care cuprind fiecare circa 60 000—80 000 de baze; 4) *supracondensarea domeniilor învecinate* (ar sta la baza formării benzilor G care apar la analiza cariotipurilor după tratarea cromosomilor cu proteaze; o astfel

de bandă ar putea conține 10—100 gene). Se apreciază că în celulele vii această organizare a ADN-ului este dinamică și flexibilă. De exemplu, în profază cromosomii sunt mai lungi decât în metafază, în timpul căreia condensarea ADN-ului este maximă. Genele care se exprimă (genele active) sunt dispuse preferențial pe suprafețele exterioare ale domeniilor, în timp ce genele supresate sunt „îngropate" în interiorul acestor bucle. Activarea unei gene ar coincide cu decondensarea porțiunii respective a „panglicii" ADN-ului și cu acetilarea tranzitorie a histonelor nucleosomale corespunzătoare; acest moment ar coincide cu sinteza ARN-ului. Unii nucleosomi asociază diverse specii de proteine nonhistone. Împreună cu histonele, aceste proteine nonhistone protejează sau izolează genele de enzimele implicate în exprimarea lor, contribuind la controlul activării genelor. Întregul eșafodaj compus din ADN, histone și proteine nonhistone este cunoscut sub numele de *„cromatină"*. Zonele mai laxe și mai palide ale cromatinei formează *eucromatina* și conțin gene structurale activate, care se transcriu în ARN. În contrast, *heterocromatina* apare densă și hipercolorabilă. Rolul său nu este complet elucidat. Anumite zone ale sale care rămân permanent condensate ar fi constituite din secvențe repetitive ale ADN-ului (vezi p. 494).

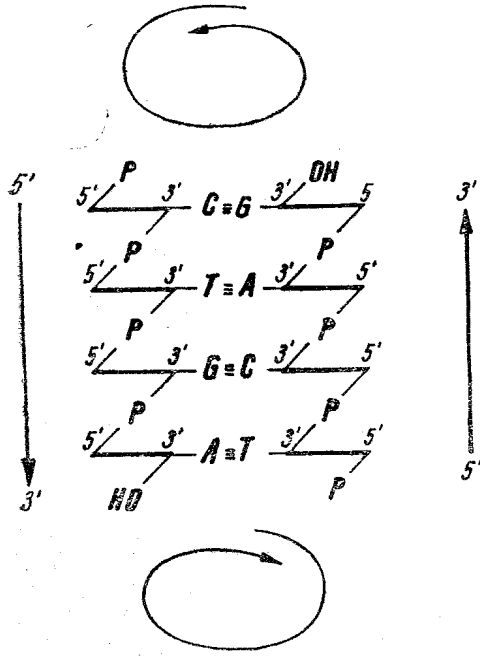


Fig. XVII.3. — Schema asamblării dublei catene de ADN.
Bazele, legate prin punți de hidrogen, sunt orientate spre interior. Săgețile drepte arată orientarea antiparalelă a celor 2 catene. Săgețile curbe indică sensurile răsucirii catenelor.

Fluxul informației în celulă. Esența vieții unei celule este prepararea succesiunii sale. Celulele somatice se reproduc prin diviziune mitotică. Durata de viață a celulei este delimitată de 2 mitoze: aceea prin care care se formează și aceea prin care se divide. În acest răstimp celula trebuie să-și dubleze constituenții protidici și nucleotidici din care se vor asambla celulele-fiice. Sinteza de proteine și sinteza de nucleotide își au originea în copierea informației genetice stocate în ADN. În prealabil, molecula nativă de ADN trebuie să se despiralizeze pentru a face posibilă citirea mesajului cuprins în catenele sale individuale. Acestea joacă rol de matrițe de pe care se reproduc molecule-fiice de nucleotide pe principiul respectării legii împerecherilor complementare a bazelor. Sinteza noilor lanțuri de polinucleotide se desfășoară în nucleul celulei și este mediată de polimeraze specifice care orientează fluxul informației în 2 direcții: *ARN-polimeraza — dependentă de ADN* (transcriptază) care asigură transcrierea individuală a genelor cu scopul utilizării mesajelor acestora pentru sinteza de proteine și *ADN-polimeraza*

care asigură recopierea integrală a ADN-ului care este destinat să fie transferat prin procesul mitozei în celulele-fiice.

Informația destinată sintezei de proteine trebuie exportată din nucleul celular în citoplasmă. Exportul de informație este îndeplinit de o specie de molecule nucleotidice monocatenare care pot părăsi nucleul, denumite ARN-mesageri (ARN-m). Structura ARN-m diferă de structura ADN-ului prin 2 amănunte: prezența ribozei (în locul dezoxiribozei) și a uracilului (în locul timinei). În transmiterea complementară a informației de la ADN la ARN-m, proces care nu implică nici o schimbare de limbaj (nucleotid → nucleotid) și denumit „transcripție", împerechile obligatorii sunt A→U, C→G, G→C și T→A. Deplasată în citoplasmă prin intermediul ARN-m, informația genetică este decodificată și convertită într-o secvență de aminoacizi a căror ordine corespunde semnificației mesajului șirului de codoni din genă, proces numit „translație" și care implică un nou limbaj (nucleotid ← → aminoacid).

Structura genei. Genele care controlează sinteza de proteine prin mecanismele transcripției și translației sunt denumite gene structurale. O genă structurală este alcătuită dintr-o secvență de nucleotide care conțin informația specifică (gena propriu-zisă) flancată de alte 2 secvențe de control și reglare care nu se transcriu: un promotor la capătul 5′ al genei și un terminator la extremitatea 3′. Promotorul conține 2 secvențe speciale, denumite „CAT" și „TATA" (după compoziția lor în baze), pe care se atașează transcriptaza și inițiază transcripția. La procariote întregul material al genei este convertit în proteină. Acest model subsistă la om numai pentru genele histonelor și cele ale interferonilor. Pentru celelalte gene umane cu structură descifrată, numai unele secvențe se transcriu în ARN-m și sunt convertite în proteine. Aceste secvențe, denumite „codante" sau „exoni" sunt separate de secvențe „intercalare" denumite și „introni". Secvențele intercalare sunt și ele transcrise în ARN-m, dar nu mai apar reprezentate în structura proteinelor. Intronii sunt delimitați de dublete specifice de baze: GT către capătul 5′ și AG la extremitatea 3′ (fig. XVII.4). Funcția intronilor nu este elucidată. Oprirea transcripției este semnalizată de terminator care este plasat în aval de genă. Expresia genei este controlată de secvențe amplificatoare și represoare ale ADN. Secvențele amplificatoare *(enhancers)* pot fi plasate în afara genei (la oricare din capetele acesteia) sau în interiorul genei (în introni). Zona de influență a unui *enhancer* se poate extinde în ambele sensuri (în amonte sau în aval). Ea poate fi limitată doar la gena adiacentă sau se poate desfășura pe arii mai largi care pot cuprinde mai multe gene. Secvențele represoare *(silencers)*, plasate în proximitatea unor gene, diminuă transcripția. Reglarea expresiei genei este îndeplinită și prin interacțiunea cu unele proteine nucleare specifice denumite „factori de transcripție" (1, 4, 19).

Transcripția și translația. Transcripția operează numai pe una din cele 2 catene ale ADN. Transcriptaza se atașează pe promotor pe care-l recunoaște prin intermediul unui oligopeptid („factorul sigma") și transcrie întreaga lungime a genei (exonii și intronii) în direcția 5′→3′ sub forma unui ARN-m primar. În alcătuirea acestui ARN-m se disting 3 zone: în poziția 5′ o structură bogată în guanină metilată denumită „*cap*" (care ar media atașarea ARN-m pe ribosom), *transcriptul propriu-*

zis (care este complementar și antiparalel filamentului de genă copiat) și o *„coadă" poliadenilată* la capătul 3′ (care ar media stabilizarea moleculei de ARN-m și migrarea ei în citoplasmă). Maturarea ARN-m are loc tot în nucleu și constă din excizia intronilor urmată de sudarea cap la cap a exonilor. Excizia este mediată enzimatic și este precedată de alipirea dinucleotidelor GT și AG ce flanchează intronii (provocând astfel curbarea acestora sub forma unor bucle care vor fi eliminate (fig. XVII.4).

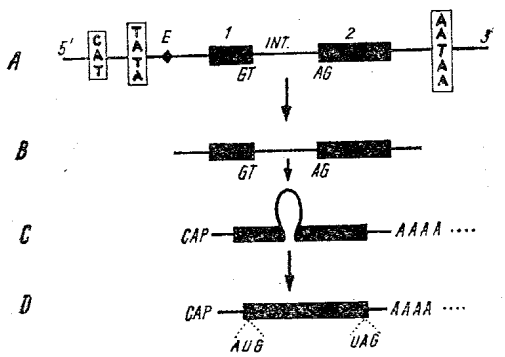


Fig. XVII.4. — Structura unei gene, transcripția și maturarea ARNm.
A. CAT și TATA = secvențe ale promoterului; 1 și 2 = exoni; INT = intron; AATAA = semnal pentru oprirea transcripției și poliadenilare; E = *enhancer.*
B. ARNm primar. GT și AG = semnale pentru excizie.
C. Maturarea ARNm: excizia intronului, sudarea exonilor, adiția secvențelor CAP și AAA...
D. ARNm matur. AUG și UAG = semnale pentru inițierea și, respectiv, terminarea translației.

ARN-m matur este transferat în citoplasmă printr-un proces activ, consumator de energie. Fenomenul exciziei este variabil: același transcript inițial poate produce în final molecule diferite de ARN-m matur, dacă mecanismul exciziei elimină doar intronii sau include și anumiți exoni. Această „excizie alternativă" permite ca aceeași genă să producă proteine în mai multe variante în corelație cu diverse ipostaze ale maturației celulare. De exemplu, într-un limfocit B aceeași genă produce și moleculele de imunoglobulină de suprafață (sIg) și moleculele de Ig-anticorpi (Atc). Imunoglobulina de suprafață, care joacă rol de receptor pentru antigen, este exprimată pe celule în curs de finalizare a maturării în timp ce Atc sunt secretați de celule complet maturate. Moleculele de sIg se deosebesc de cele ale Atc doar prin faptul că prezintă la capătul lor COOH, o piesă de ancorare în membrană. Această secvență de aminoacizi lipsește din moleculele de Atc și această diferență este rezultatul variațiilor secționării transcriptului primar.

Translația este îndeplinită prin interacțiunea dintre 3 specii de molecule monocatenare de ARN: ARN-mesager — purtătorul mesajului, ARN ribosomal (ARN-r) — care dirijează citirea mesajului și ARN de transfer (ARN-t) — care realizează decriptarea. Se estimează că genomul uman ar conține până la 100 000 de gene structurale care ar specifica fiecare câte o moleculă de ARN-m. În contrast, varietatea ARN-r și ARN-t este foarte restrânsă. Se cunosc doar 4 tipuri moleculare de ARN-r și 56 de tipuri de molecule de ARN-t. Spre deosebire de ARN-m, care reprezintă replica genei structurale, ARN-r și ARN-t sunt produși de alte tipuri de gene, care sunt prezente în numeroase copii risipite în genom. ARN-r se complexează în citoplasmă cu diverse proteine, împreună cu care formează agregate globuloase denumite *ribosomi.* Mai mulți ribosomi se atașează succesiv pe o panglică de ARN-m și alunecă de-a lungul acesteia, ca o cheie de fermoar, în direcția 5′→3′, trecând de la

un codon la altul. Ribosomii sunt prevăzuți cu lăcașe în care se ajustează molecule de ARN-t. Fiecare moleculă de ARN-t are anexată la un capăt câte un aminoacid, iar la polul opus exprimă o tripletă de nucleotide — anticodonul — cu structură complementară unui codon din ARN-m. ARN-t interacționează specific numai cu codonii în dreptul cărora sunt plasați ribosomii. Alăturarea succesivă a moleculelor de ARN-t permite o apropiere a aminoacizilor, propice pentru legarea lor prin punți peptidice. După legarea aminoacidului, ARN-t respectiv se desprinde din complexul ribosomal care se mișcă în continuare cu un codon având fixat de el, ca un panaș, lanțul polipeptidic în curs de formare. Procesul continuă până ce ribosomul în mișcare întâlnește pe ARN-m un codon terminator, după care complexul se dezasamblează și ciclul se reia pe altă moleculă de ARN-m. Transcripția asigură corespondența strictă dintre șirul de nucleotide din genă și secvența aminoacizilor din proteina codificată de genă (fig. XVII.5).

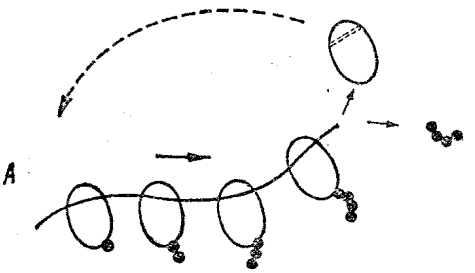


Fig. XVII.5. — Reprezentarea schematică a procesului de translație. Prin deplasarea complexului ribosomal de-a lungul ARNm (vezi săgeata), se atașează succesiv aminoacizii corespunzători mesajului genetic.

Replicarea ADN-ului. Dacă transcripția este un proces segmentar care implică numai copierea genelor activate din cromosomi, replicarea este un proces global al ADN care implică cromosomii în întregime. Replicarea are loc numai în faza S a ciclului celular spre deosebire de sinteza de proteine care se desfășoară aproape continuu. Pentru a asigura copierea integrală a ADN în limita de timp a fazei S, replicarea începe concomitent în mai multe puncte ale ADN, denumite „puncte de inițiere", prin despiralizarea moleculei. Separarea catenelor evoluează apoi din aceste puncte în ambele direcții, într-un mod care amintește un soi de sfâșiere în lung a dublului helix. Punctele unde cele 2 catene sunt încă unite se numesc „furci de replicare". ADN-polimeraza construiește lanțurile noi de ADN în direcție 5′→3′, dar cum catenele parentale de pe care se face copierea au orientare antiparalelă, sinteza catenelor-fiice trebuie să se facă din direcții opuse: pe catena matriță 5′—3′ sinteza catenei-fiică se face dinspre originea replicării către furca de replicare prin adiție continuă de nucleotide, iar pe catena 3′—5′ sinteza se desfășoară în sens invers dinspre bifurcație către punctul de inițiere. Deoarece concomitent cu sinteza acestui al doilea lanț furca de bifurcare se deplasează în sens invers, procesul se reia din alt punct. Din acest motiv copierea catenei 3′—5′ se face discontinuu prin fragmente scurte (fragmentele Okazaki) (fig. XVII.6). În momentul în care, prin alungirea lor, aceste fragmente ajung să se unească, ele sunt sudate de o ligază. Modul de acțiune a ADN-polimerazei are unele particularități. Pentru a începe copierea, enzima are nevoie de existența unei secvențe scurte de nucleotide care să prezinte o grupare —OH la capătul său 3′. Această secvență de amorsare *(primer)* este un lanț scurt de ARN. Primer-ul (amorsa) este sintetizat de o altă polimerază („primaza") după matrița

catenei parentale. Primer-ii sunt produşi din loc în loc pe lanţul de ADN şi sunt alungiţi de ADN-polimerază prin adiţionarea succesivă de dezoxiribonucleozide-trifosfatate după tiparul ADN (cu formarea fragmentelor Okazaki). În momentul când aceste structuri mixte (ARN+ADN) în creştere continuă ajung să se atingă, primer-ii sunt eliminaţi permiţând alungirea în continuare a fragmentelor nou formate până la fuzionarea lor.

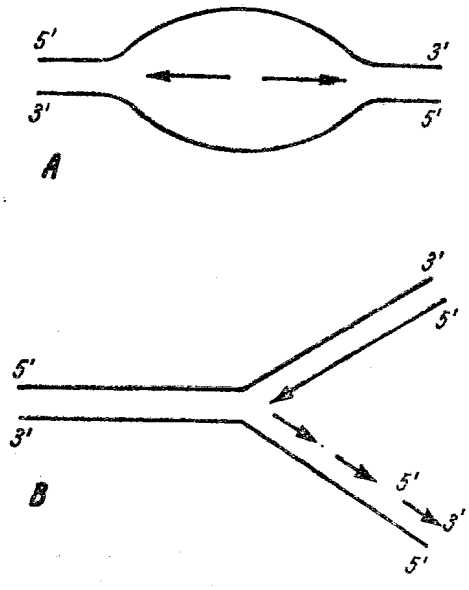


Fig. XVII.6. — Replicarea ADN. A. Separarea catenelor şi direcţia deplasării furcilor de replicare. B. Formarea catenelor-fiice. Fragmentele Okazaki sunt reprezentate prin săgeţi scurte.

Graţie procesului de replicare, întreaga informaţie genetică poate fi transmisă din generaţie în generaţie, prin intermediul a nenumărate mitoze. Această zestre informaţională care pentru specia umană este cifrată la aproximativ 3 bilioane de „litere", trebuie însă copiată fără greşeală deoarece inserarea eronată a unui nucleotid, o „mutaţie", schimbă sensul codonului respectiv şi implicit funcţia genei. Din acest motiv, replicarea este autocontrolată prin 3 procese enzimatice concertate: selectarea nucleotidului potrivit (efectuată de ADN-polimerază), „recitirea" de probă a ultimului nucleotid ataşat, excizia lui dacă este noncomplementar (îndeplinită de o exonuclează) urmată de cuplarea nucleotidului corect, şi, în final, o corecţie suplimentară a erorilor persistente (îndeplinite de alte enzime specifice). Corecţia erorilor este ghidată de structura catenei parentale de ADN. Mecanismul este deosebit de eficient deoarece reduce rata erorilor care scapă necorectate la 1 din 10 000 000 împerecheri de baze (26, 44).

Organizarea ADN-ului în genom. Genele structurale reprezintă mai puţin de 10% din totalul ADN. Ele sunt separate unele de altele prin porţiuni de ADN cu lungimi diferite, de la câteva kb până la mii de kb denumite şi „secvenţe non-sens". Ansamblul moleculei de ADN are o organizare foarte complexă în care se pot identifica:

1) *Secvenţe unice:* sunt prezente ca exemplare unice sau sub forma câtorva copii. Însumează circa 60% din totalul ADN. O parte din aceste secvenţe unice sunt reprezentate de genele structurale.

2) *Secvenţe moderat repetitive:* reprezintă circa 30% din structura ADN. Pot fi diseminate sau adunate în grupuri. Unele dintre aceste secvenţe moderat repetitive formează familii de gene funcţionale, cu multiple copii risipite în genom (printre acestea se numără genele histonelor sau cele ale ADN-r). Alte secvenţe repetitive nu au semnificaţie determinată. Ele apar fie dispersate, fie asociate în tandemuri. Printre

secvențele dispersate, circa 300 000 pot fi depistate prin digestia ADN cu endonucleaza „Alu 1". „Secvențele Alu" cuprind fiecare câte 300 de baze. Funcția lor nu este determinată, dar ele par a fi specifice numai genomului uman. Secvențele în tandem se dispun mai frecvent la nivelul unui singur locus al unui cromosom dat și sunt formate din șiruri de unități identice (în care o unitate cuprinde câteva zeci de baze). Numărul acestor secvențe în tandem care există într-un locus variază de la un individ la altul și este determinat genetic pentru fiecare din cei 2 cromosomi ai perechii respective. Determinarea acestor variații individuale servește pentru unele studii populaționale sau pentru stabilirea paternității.

3) *Secvențe înalt repetitive:* reprezintă doar 10% din genom. Sunt repetate de sute de mii de ori (sau chiar de milioane de ori) și nu sunt transcrise. Sunt grupate adesea sub formă de tandemuri scurte la nivelul regiunilor heterocromatice ale cromosomilor 1, 9, 16 și y și sub forma unor tandemuri ceva mai mari la nivelul centromerilor.

METODE DE ANALIZĂ STRUCTURALĂ

Secționarea restrictivă a ADN (1, 19, 29, 42, 50). Din punct de vedere chimic, macromolecula de ADN este extrem de monotonă: aceleași 4 baze se repetă de 3×10^9 ori, iar suma purinelor este egală cu aceea a pirimidinelor. Aceste particularități au constituit până nu de mult obstacole importante în depistarea variațiilor individuale care pot exista între specimene de ADN de proveniențe diferite (celule sau indivizi). În prezent aceste studii sunt mult ușurate de introducerea metodei secționării chimice a ADN cu ajutorul unor enzime speciale denumite endonucleaze de restricție. Endonucleazele sunt o specie de enzime, capabile să degradeze molecula de ADN prin hidroliza legăturilor interne fosfodiesterice (vezi fig. XVII.2). Endonucleazele de restricție sunt produse de bacterii, care se servesc de ele ca arme de apărare cu care pot distruge un ADN străin care le invadează (de exemplu, după parazitarea lor de către bacteriofagi). Termenul de „restricție" se referă la faptul că fiecare asemenea enzimă atacă ADN-ul străin în puncte precise (reprezentate de mici secvențe de 4 până la 6 nucleotide) unde produce scindarea acestuia. Lungimea „fragmentelor de restricție" diferă în funcție de distanțele la care sunt plasate secvențele nucleotidice asupra cărora operează enzima. Digestia propriului ADN este evitată printr-o „camuflare" biochimică: metilarea unor adenine sau citozine din structura oligosecvențelor recunoscute de enzimă.

Până în prezent s-au descris circa 500 de endonucleaze de restricție, care sunt denumite cu simboluri inspirate de numele bacteriilor care le produc (tabelul 17.I). Punctele de secționare ale celor două catene de ADN pot fi suprapuse sau decalate. În prima situație, capetele fragmentelor sunt boante (sau „netede"). În cea de-a doua, la capătul fiecărei catene rămân câteva nucleotide libere. Aceste capete au fost denumite „adezive" deoarece pot lega prin complementaritate fragmente cu capete

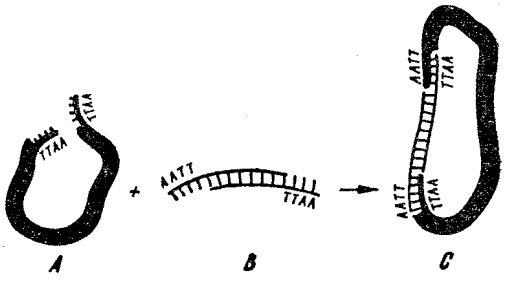


Fig. XVII.7. — Unirea a 2 fragmente „adezive" de ADN, obținute în urma digestiei cu EcoR I, prin împerecherea complementară a bazelor înșiruite la capetele lor libere.
Mecanismul permite, de exemplu, inserarea unui segment de ADN de studiat (B) într-o plasmidă (A). Astfel de plasmide hibridizate (C) servesc pentru diverse manevre în ingineria genetică.

libere asemănătoare produse prin digestie cu aceeași enzimă (fig. XVII.7). Datorită acestui fapt se pot construi *in vitro* molecule hibride (recombinate) cum ar fi, de exemplu, vectorii utilizați pentru clonarea moleculară.

Secționarea restrictivă a ADN reprezintă un element cvasiindispensabil al actualelor tehnologii de studiu în genetica moleculară. Separate prin electroforeză, după mărime, fragmentele de digestie pot fi mai ușor analizate decât molecula întreagă de ADN. Digerarea unui eșantion de ADN cu mai multe enzime de restricție permite, prin comparație, reconstituirea dispunerii situsurilor de acțiune enzimatică pe cromosomi. O astfel de reprezentare grafică constituie o *hartă de restricție* pe baza căreia se poate stabili aranjarea unor secvențe de nucleotide într-o anumită regiune genetică. Compararea hărților de restricție ale unor gene similare sau înrudite poate evidenția *omologii structurale între specii* (ca, de exemplu, între secvențe de nucleotide care, specifică globinele omului și cimpanzeului) sau *filiații genice* (genele globinelor normale, α și non-α, au apărut în filogeneză după mutații și duplicări succesive

TABELUL 17.1

Exemple de endonucleaze de ristricție

Enzima	Bacteria de origine	Secvențe de clivaj
Eco R I	*Escherichia coli*	5'---G↓AATTC---3' 3'---CTTAA↑G---5
BAM H I	*Bacillus amyloliquefaciens H*	5'---G↓GATCC---3' 3'---CCTAG↑G---5'
Hac III	*Haemophilus aegyptiens*	5'---GG↓CC---3' 3'---CC↑GG---5'
Hind III	*Haemophilus influenzae Rd*	5'---A↓AGCTT---3' 3'---TTCGA↑A---5'
Hpa II	*Haemophilus parainfluenzae*	5'---C↓CGG---3' 3'---GGC↑C---5

ale unei gene ancestrale care codifică o proteină arhaică transportoare de oxigen).

În plus, aplicarea metodei de secționare biochimică a ADN a dezvăluit existența unor evenimente genetice necunoscute în prealabil: fragmentele decupate de o enzimă dată din ADN-uri provenite de la persoane diferite nu au lungimi identice. În limbaj tehnic, această variație dimensională, a fost denumită „polimorfism al lungimilor fragmentelor de restricție" (*restriction fragment lenght polymorphism*=RFLP), care se moștenește ca o trăsătură mendeliană codominantă. RFLP sunt rezultatul unor mutații punctiforme (substituiri ale unei singure baze din alcătuirea unui codon, care fie că abolesc un situs de excizie al unei endonucleaze de restricție, fie că formează un situs nou). Prin aceasta se elimină sau se creează un fragment de restricție din mulțimea celor produse prin digestia ADN-ului cu enzima dată. Împreună cu variația numerică a tandemurilor repetitive, RFLP reprezintă markeri moleculari individuali de mare utilitate pentru diagnosticul unor maladii ereditare și au aplicații largi în medicina legală (de exemplu pentru stabilirea paternității, deoarece se transmit ca trăsături relativ stabile și în acest mod joacă rolul unor adevărate „amprente" genetice). Mutațiile care se soldează cu RFLP afectează, de regulă, baze „silențioase" plasate în regiunile intergenice (noncodante) ale ADN și prin aceasta nu au răsunet clinic (fenotipic). Din acest punct de vedere ele sunt considerate „fiziologice" și se deosebesc de mutațiile care afectează structura genelor și care produc deces sau boală. Uneori însă mutațiile patologice pot interesa situsurile de clivaj ale unor endonucleaze. De exemplu, endonucleaza Mst II are un situs de acțiune plasat exact pe locusul codonului care devine mutant în siclemie. Mutația siclemică abolește acest situs și astfel se dezvăluie anomalia genei prin apariția la electroforeză a unui segment de ADN cu lungime anormală. Pe acest principiu se poate face diagnosticul prenatal al siclemiei prin analiza ADN-ului din celulele amniotice.

Sinteza unor fragmente complementare de ADN (cADN). Mesajul unui ARNm cu structură cunoscută poate fi „retranscris" într-un fragment de cADN. În acest mod se poate recompune o genă în laborator. Metoda reproduce *in vitro* mecanismul prin care virusurile ARN își introduc informația genetică în ADN-ul celulelor-țintă: ARN viral este convertit cu ajutorul transcriptazei inverse într-un cADN viral care, apoi, se inseră în genomul celulei parazitate. Pentru a face posibilă reacția de transcriere inversă *in vitro,* se introduce în sistem pe lângă ingredientele de bază (ARNm, revers-transcriptază și dezoxinucleotide) și un primer ADN. Deoarece enzima copiază ARNm în sensul 3′→5′, adică de la coadă la cap, primerul adecvat va fi un oligonucleotid bogat în dezoxitimidină, deci complementar segmentului poli AAAAA din coada ARNm. Pe acest principiu s-a putut determina, de exemplu, secvența din gena factorului VIII al coagulării care corespunde porțiunii codante a ARNm specific (25). Această secvență complementară reprezintă înșiruirea celor 26 de exoni ai genei și codifică un macropeptid funcțional format din 2 332 aminoacizi cu o greutate moleculară de 264 743. Pornind de pe aceste baze, s-a reușit, prin inginerie genetică, reproducerea de factor VIII recombinant care este folosit în prezent pe scară largă pentru tratamentul hemofiliei A.

Hibridizarea moleculară. Două segmente monocatenare de ADN, sau o monocatenă de ADN și una de ARNm, provenite fiecare de la indivizi diferiți sau de la specii diferite, se unesc *in vitro* pe baza legii împerecherii bazelor, dacă secvențele lor de nucleotide sunt omoloage. Moleculele rezultate sunt considerate „hibride" deoarece sunt formate prin împerecheri de lanțuri cu origini diferite. Dacă se cunoaște secvența de baze a uneia din cele 2 catene este posibilă recunoașterea și determinarea secvenței de baze a catenei partenere. Fragmentele de ADN (sau de ARN) cu secvență cunoscută care servesc ca instrumente de identificare au fost denumite „sonde nucleice". Sondele pot fi preparate prin izolarea (sau sinteza) unor fragmente de genă, sau prin extragerea unei specii unice de ARNm dintr-o populație celulară dată (de exemplu, din reticulocite care conțin aproape exclusiv ARNm pentru globină). Sondele sunt „marcate" (cu fluorocromi, cu radioizotopi sau cu enzime). Aceasta permite vizualizarea cuplării sondei cu secvența de recunoscut, prin intermediul unor tehnici adecvate (respectiv, prin fluorescență, autoradiografie sau reacții de culoare). Prin hibridizare moleculară poate fi depistată și caracterizată orice secvență de nucleotide dintr-o mixtură de molecule de ADN extrasă din celule, chiar dacă se rezumă cantitativ doar la câteva picograme. Pentru a face posibilă cuplarea sondei pe substrat este necesar să se provoace în prealabil ruperea legăturilor care unesc între ele cele două catene ale ADN-ului nativ de analizat. Separarea catenelor (denumită în limbaj tehnic „denaturare") poate fi provocată prin încălzire sau cu ajutorul unor denaturanți chimici. Metoda hibridizării moleculare constituie o deschidere nouă în cercetare, cu aplicații în citologie, histologie și histopatologie, care permite diagnosticul unor infecții virale, testarea paternității, depistarea prenatală a defectelor genetice sau identificarea unor gene și a mutațiilor acestora.

Hibridizarea poate fi executată în fază lichidă sau pe un suport solid. În prima variantă, extractul de ADN interacționează cu sonda într-un mediu lichid (denumit cocteil de hibridizare). Deoarece oligocatenele hibridizate pot fi fixate selectiv pe o matrice solidă de hidroxiapatită, sondele rămase libere în soluție pot fi îndepărtate prin spălare, ceea ce permite evaluarea corectă a cuplărilor. Metoda este utilizată pentru depistarea unor secvențe genetice particulare (39).

În cazul hibridizării pe suport solid, ambii reactanți (ADN-ul și sondele) sunt atașați de la început pe matricea care servește ca sediu al formării duplexurilor. În metoda „dot/blot", de exemplu, probele de ADN se dispun și se incubează cu sondele marcate pe membrane de nailon sau pe nitroceluloză, pe care, în final, se va înregistra semnalul (ca un punct sau ca o pată) (32, 39).

Hibridizarea *in situ* este o variantă specială a hibridizării pe suport solid. Se execută direct pe frotiuri celulare, pe secțiuni de țesuturi proaspete sau fixate, sau pe cromosomi. Este un compromis tehnic între metoda hibridizării și metodele uzuale de fixare-colorare (Giemsa, hematoxilină-eosină): materialul de studiu etalat pe lame de sticlă și preparat după metodele citomorfologice standard este supus mai întâi hibridizării, după care este colorat și examinat în microscopie optică sau fluorescență în funcție de tipul marcării sondei. Permite localizarea semnalului modificării genetice în celule sau cromosomi, cu păstrarea integri-

tăţii morfologice a acestora şi detectarea celulelor marcate chiar dacă numărul lor este redus şi distribuţia lor în preparate este neuniformă. Oferă în plus posibilitatea unor diagnostice retroactive (19).

Transferarea in vitro a materialului genetic de pe un suport pe altul. Identificarea cu sonde a fragmentelor de ADN sau a moleculelor de ARN, separate în prealabil prin electroforeză în gel de agaroză, necesită pentru acurateţea lucrului transferarea acestora de pe suportul moale pe care au fost supuse migrării, pe un suport solid (membrană de nitroceluloză sau de nailon). Pentru aceasta, placa de electroforeză se acoperă cu noul suport care absoarbe prin capilaritate moleculele de nucleotide migrate, la fel cum o hârtie sugativă absoarbe cerneala umedă de pe un manuscris. Această imagine a sugerat termenul anglosaxon al metodei: *„blotting"* (de la *to blot*=a usca cerneala, a păta). Pe acest principiu s-au elaborat mai multe metode de studiu: *Southern blot* (după numele inventatorului — Edwin Southern) (45) pentru analiza ADN, *Northern blot* pentru analiza ARN (2) şi *Western blot* pentru analiza unor proteine care sunt identificate însă cu anticorpi în loc de sonde nucleice. Pentru analiza materialului genetic timpii de bază sunt: migrarea electroforetică a fragmentelor, transferul *(blotting),* incubarea cu sonda radioactivă şi autoradiografia pentru evidenţierea cuplării sondei cu secvenţa de identificat. Diferenţele între tehnicile citate sunt dictate de materialul de studiu. În *Southern blot,* de exemplu (fig. XVII.8), se începe cu fragmentarea ADN-ului cu endonucleaze şi se intercalează înaintea transferării, denaturarea fragmentelor cu alcali pentru a permite hibridizarea sondei. Semnalul va apărea acolo unde sonda se cuplează cu o secvenţă complementară din ADN-ul supus analizei. ADN-ul de examinat poate fi un extract brut dintr-o suspensie de celule proaspăt recoltate sau un extract din celule întinse pe frotiuri şi amplificat ulterior cu polimerază pentru realizarea cantităţii optime cerute de metodă (11). În *Northern blot,* extractul de ARNm este supus mai întâi electroforezei, pentru separarea după mărime a moleculelor sale componente, după care este transferat şi incubat cu sonda ADN specifică genei de pe care s-a transcris ARN-ul care interesează. Metoda permite estimarea cantitativă şi dimensională a moleculelor specifice de ARNm şi este utilă în studiul unor boli genetice a le globulului roşu cum ar fi, de exemplu, talasemia (3).

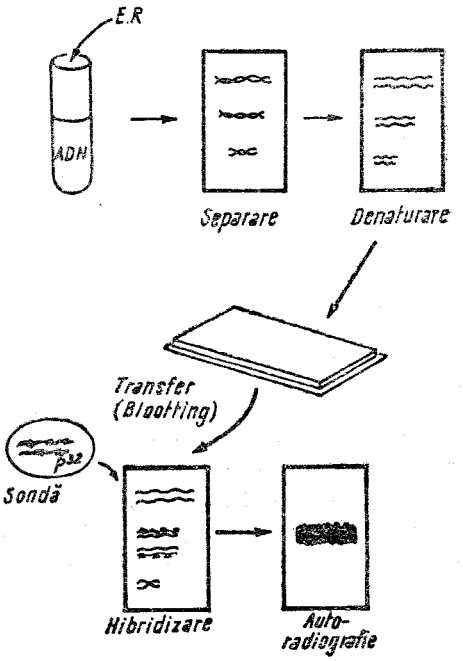


Fig. XVII.8. — Identificarea unor secvenţe de ADN prin metoda *Southern blot.*

Recent s-au imaginat metode de marcare a sondelor cu substanțe nonradioactive (24), care evită expunerea accidentală și consumul mare de timp, care sunt imputabile metodei originale. În aceste metode noi, o parte din nucleotidele sondei specifice sunt dislocate enzimatic și înlocuite cu alte nucleotide identice care au fost cuplate în prealabil cu un marker antigenic (biotină sau digoxigenină). Sondele astfel marcate hibridizează cu secvențele complementare din ADN-ul de analizat. Un antimarker cuplat cu o enzimă plus un substrat cromogen sau chemiluminiscent va servi pentru evidențierea hibridizării (evidențierea benzii specifice în *Southern blot*). De exemplu, dacă markerul este digoxigenina, antidigoxigenina (antimarkerul) poate fi cuplată cu fosfatază alcalină +nitrobluetetrasolium sau, respectiv, cu FA1+dioxetan. Acesta din urmă generează compuși instabili care, pe măsură ce se degradează, emit lumină (chemiluminiscență) (13) care poate fi înregistrată pe o peliculă fotosensibilă.

Multiplicarea in vitro a fragmentelor de ADN (PCR și clonarea moleculară). O secvență de material genetic poate fi selectată după dorință, dintr-un extract global de ADN cromosomial și multiplicată *in vitro*, de mai multe milioane de ori, cu ajutorul ADN polimerazei, printr-o tehnică simplă și foarte precisă, denumită *„reacția în lanț cu polimerază"* (*polymerase chain reaction*=PCR) (12, 30, 31). În mare, PCR reproduce *in vitro* mecanismul replicării ADN-ului în celule. Pentru ca sistemul să funcționeze corect, trebuie să întrunească câteva condiții: 1) să conțină ingredientele necesare ADN-ului de studiat (polimerază, primeri și cele 4 tipuri de nucleotide trifosfatate: C, A, G, T); 2) polimeraza să reziste la temperatură de 95°C, cerută pentru denaturarea ADN-ului (condiția este îndeplinită de polimeraza unei bacterii termofile *Thermus aquaticus;* 3) secvențele primerilor să fie complementare cu secvențele extremităților 5′ ale catenelor partenere din care este format fragmentul de ADN care se dorește să fie amplificat. Pentru aceasta se folosesc perechi de primeri prefabricați care, fiecare, hibridizează la un pol al uneia din cele 2 catene opuse ale fragmentului denaturat de ADN; în acest mod amplasarea primerilor pe cele 2 catene devine decalată cu câteva sute de baze; acest decalaj determină lungimea fragmentului care va fi multiplicat prin PCR (fig. XVII.9). Fiecare ciclu de multiplicare necesită câteva minute în timpul cărora operatorul încălzește proba (pentru denaturarea ADN-ului) și apoi o răcește (pentru a permite hibridizarea primerilor și declanșarea acțiunii polimerazei, de sinteză a catenelor complementare după tiparul ADN). Cu fiecare ciclu, numărul fragmentelor autoreproduse se dublează, astfel că de exemplu, după n cicluri fragmentele inițiale sunt multiplicate de 2^n ori. Fiind capabilă să detecteze o secvență specifică dintr-un milion de probe, în timp foarte scurt, PCR a devenit una din cele mai prețioase metode utilizate în genetica moleculară cu aplicații variate în diagnosticul bolilor genetice (de exemplu: talasemie, siclemie, hemofilie), în diagnosticul unor infecții cu virusuri persistente sau necultivabile (permite, de exemplu, depistarea infecției HIV înaintea producerii seroconversiei sau a infecției cu acele variante ale virusului hepatitei B care nu produc modificări serologice), în diagnosticul unor forme de tuberculoză, în determinarea paternității, în cercetarea criminalistică.

Recent s-au elaborat tehnici de extracție și purificare a unor secvențe intacte de ADN provenite din fragmente de țesuturi fixate și incluse în parafină sau din frotiuri celulare colorate sau necolorate și păstrate la temperatura camerei (11). Aceste extracte se pretează la amplificare prin PCR, hibridizare și analiză moleculară *(Southern blot)*. Prin aceasta a devenit posibilă evidențierea unor anomalii ale ADN-ului recoltat din materiale tisulare sau celulare de arhivă, chiar și după mai

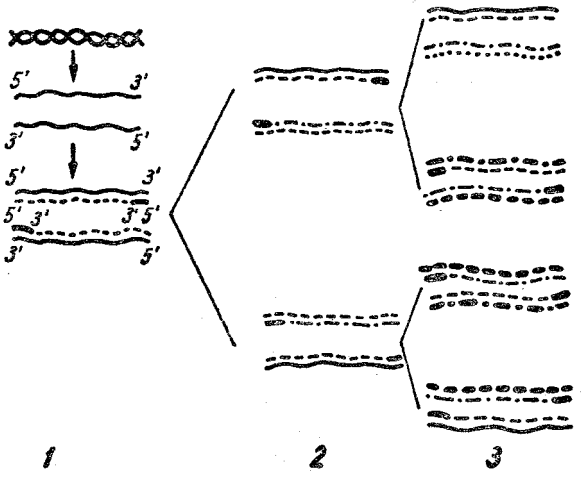


Fig. XVII. 9. — Multiplicarea ADN prin reacția în lanț cu polimerază.
1 = Detalierea unui ciclu: denaturarea ADN, atașarea primerilor și alungirea lanțului complementar. 2 și 3 = Ilustrarea multiplicării prin cicluri succesive.

mult de 10 ani de stocare. Metoda permite verificarea retrospectivă a corectitudinii diagnosticelor unor boli maligne sau de graniță, studiul unor boli genetice sau al unor boli rare.

Multiplicarea prin polimerază se adaugă metodei mai vechi și mult mai laborioase a *„clonării moleculare"* (1, 42), care realizează amplificarea fragmentelor selecționate de ADN uman, prin inserarea lor într-o clonă bacteriană, prin intermediul unui vector. În acest sistem, vectorii joacă rol de molecule-cărăuși, capabile să traverseze membrana bacteriană și să introducă „prin contrabandă" fragmentele de ADN de studiat în gazdele bacteriene care servesc ca simple mașini de multiplicare. Vectorii sunt molecule de ADN bacterian sau viral pe care se altoiesc segmentele de ADN uman luate în studiu. Ei trebuie să aibă talie mică, să fie acceptați de celulele-gazdă, să aibă capacitate de replicare autonomă, să exprime un marker de identificare și un situs de clivaj specific unei endonucleaze de restricție care să fie plasat într-o zonă neutră (care nu alterează secvențele lor funcționale. Aceste proprietăți sunt întrunite în 3 tipuri de vectori: plasmide, bacteriofagi și cosmide.

Plasmidele sunt molecule circulare de ADN extracromosomial care plutesc liber în citoplasma unor specii bacteriene, cărora le conferă rezistență la antibiotice. Ele se pot transfera de la o bacterie la alta, în cadrul aceleiași specii, printr-un mecanism natural denumit „conjugare". Plasmide izolate de E. Coli pot fi secționate *in vitro* cu Eco R I, iar pe capetele adezive rezultate, pot fi lipite fragmentele de ADN uman decupate în prealabil cu aceeași enzimă. În acest mod se reface configurația inelară a noii structuri hibride, care poate fi introdusă în colibacili. Deoarece plasmida conține gene pentru rezistența la unele antibiotice, bac-

teriile tratate sunt cultivate pe plăci acoperite cu mediu de cultură semisolid care a fost suplimentat cu respectivele medicamente. Astfel, pot fi selectate bacteriile portante care, putând prolifera nestingherit, formează colonii (clone) vizibile.

Bacteriofagii sunt virusuri ale bacteriilor. Ca toate virusurile luate în general, ei se comportă ca sisteme de gene mobile care pătrund în celule-țintă specifice în care pot adopta, în mare, două modele de comportament: inducerea ciclului de infecție litică sau interacțiunea lizogenică. În prima situație, fagii preiau comanda asupra aparatului genetic al celulei pe care-l depolimerizează pentru a-și procura nucleobazele necesare propriei replicări. În acest fel, în circa 20 de minute, se formează 100—200 de virioni noi care, după liza celulei gazde, vor infesta celule învecinate. Prin interacțiunea lizogenică ADN-ul fagului se integrează în ADN-ul celulei-gazdă (care supraviețuiește) și se va multiplica împreună cu aceasta.

Pentru scopurile multiplicării clonale de gene este frecvent folosit bacteriofagul λ, care este specific pentru E. coli. El posedă un ADN linear prevăzut la cele 2 extremități cu capete monocatenare libere care, fiind complementare, se comportă ca niște capete adezive. De aici provine numele lor de „situsuri COS" *(cohesive sites)*. Digestia cu Eco R I rupe ADN-ul fagului în 3 fragmente, dintre care cel central se elimină. În locul acestuia se inseră un fragment cu lungime egală de ADN uman. După învelire cu proteine virale, noua structură hibridă se introduce în E. coli care se cultivă pe plăci. Bacteriofagii recombinanți intră în ciclul litic. Mai multe cicluri succesive de infecție, multiplicare și bacterioliză duc la formarea unor plaje clare pe placa de cultură care conțin fiecare sute de fagi hibridizați cu ADN uman.

Situsurile COS pot fi excizate separat și sudate pe fragmente de ADN uman. Structurile astfel obținute au proprietatea de a se replica la fel ca plasmidele (de aici și numele lor tehnic de *cosmidă*) și pot fi introduse în bacterii în care se multiplică.

În final, coloniile de bacterii transformate (dacă vectorul a fost o plasmidă sau o cosmidă), sau plajele de liză (în cazul folosirii bacteriofagilor) conțin fiecare copii multiplicate ale câte unui singur fragment din ADN-ul studiat. În ansamblu, plăcile cu colonii sau cu plaje pot conține, multiplicate, toate genele subiectului luat în studiu (constituind o „bibliotecă de gene"). Identificarea unei anumite gene dintr-o colecție atât de vastă necesită utilizarea de sonde radioactive specifice. De-abia după aceea se poate trece la izolarea, purificarea și analiza secvențială a segmentului de ADN care interesează.

Determinarea secvenței de baze a ADN. Procedura este utilizată pentru stabilirea structurii genelor și, în continuare, pentru deducerea secvenței de aminoacizi codificate de acestea. Ea permite, de asemenea, identificarea mutațiilor care nu modifică situsuri de clivaj ale enzimelor de restricție și deci nu pot fi identificate prin *Southern blot*. Principial, identificarea succesiunii bazelor unui segment de ADN poate fi realizată fie folosind acel segment ca tipar după care se construiesc mici fragmente complementare radiomarcate descifrabile (metoda Sanger) (43), fie supunându-l unui clivaj chimic selectiv la nivelul sediului unor anumite baze (metoda Maxam—Gilbert) (27).

Metoda Sanger funcționează după un principiu asemănător cu cel al PCR: catena de ADN care trebuie descifrată (tiparul) este copiată cu ajutorul polimerazei care alungește un primer prin atașarea rând pe rând a dezoxinucleotidelor (DN) complementare. În această mixtură se adaugă didezoxinucleotide (DDN), care atunci când sunt încorporate blochează alungirea catenei copiate. Reacția se execută în 4 eșantioane, care conțin fiecare, numai câte un singur tip de DDN (de exemplu, DDN-A, DDN-T, DDN-C sau DDN-G) adăugat ingredientelor de bază și se soldează cu elaborarea unor fragmente a căror lungime față de primer (Pr) este desemnată de locul atașării DDN respectiv (Pr+DDN, Pr+DN+DDN, Pr+2DN+DDN etc...). Fragmentele se separă prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă (PEG) care este capabilă să separe molecule a căror lungime diferă doar printr-un singur nucleotid. Cunoscând care anume DDN este atașat la capătul fragmentelor se poate determina secvența bazelor din catena tipar (fig. XVII.10).

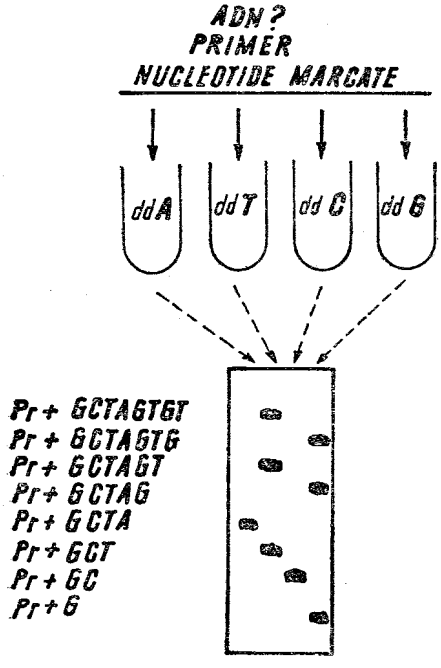


Fig. XVII.10. — Principiul metodei Sanger.
Sinteza lanțurilor complementare ADN-ului de analizat este blocată prin atașarea didezoxinucleotidelor. Prin condițiile de lucru toate segmentele nou sintetizate dintr-o probă se termină cu același nucleotid, iar separarea lor după mărime exprimă numărul de baze care separă acest nucleotid terminal de primer. Combinând mărimea cu nucleotidul terminal se poate deduce secvența catenei primare.

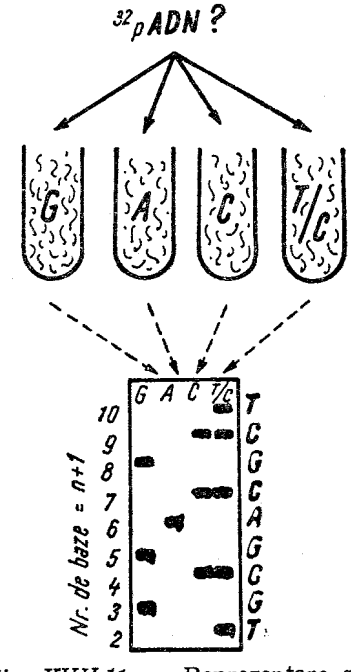


Fig. XVII.11. — Reprezentare schematică a metodei Maxam-Gilbert.
După marcare radioactivă, fiecare moleculă de ADN este scindată chimic într-un singur punct. Fragmentele obținute sunt separate și identificate prin autoradiografie. Fiecare bandă reprezintă un segment clivat la nivelul unei baze date (vezi coloanele). Poziția benzilor indică lungimea fragmentelor (n). Locul bazei în catena originală a ADN se deduce din formula n+1.

Metoda Maxam—Gilbert se bazează pe capacitatea unor substanțe chimice de a cliva ADN la nivelul unor baze (G, A, C și T sau C). Condițiile de lucru sunt stabilite în așa fel încât să se producă o singură secționare per catenă de ADN. ADN-ul de studiat se marchează radioactiv prin atașarea unui atom de ^{32}P la capătul 5′ al fiecărui catene, după care catenele complementare sunt separate și se procedează la clivarea dirijată a monocatenelor în 4 tuburi (câte unul pentru fiecare din reactivii semnalați mai sus). Fragmentele de ADN obținute în cele 4 tuburi sunt separate electroforetic, simultan pe același pat de PEG. Datorită performanței ridicate a procedurii de electroforeză, lungimea fragmentelor diferă cu o singură bază. Deoarece fragmentele sunt marcate, benzile de migrare corespunzătoare pot fi evidențiate prin autoradiografie. Aprecierea structurii moleculare se bazează pe principiul conform căruia dacă un fragment format din n nucleotide este generat prin clivarea la nivelul unei anumite baze, atunci acea bază este plasată în catena originală de ADN în poziția n+1 față de capătul 5′ (fig. XVII.11).

MODELE LEZIONALE

Studiile de genetică moleculară își găsesc largi aplicații în diagnosticul și monitorizarea unor număr mare de boli hematologice ereditare sau dobândite care sunt determinate de alterări în structura ADN-ului. Remanierile structurale ale ADN-ului pot fi grosolane, cu modificarea aspectului unor cromosomi (și deci sesizabile prin examen citogenetic, ca în cazul translocațiilor) sau discrete (și perceptibile numai prin studii moleculare) ca în cazul unor recombinări, al unor deleții sau în acela al mutațiilor punctiforme. Mutațiile pot afecta microanatomia genelor sau pot interesa nucleotide ale regiunilor intergenice ale ADN.

Mutațiile din interiorul genelor pot interesa oricare din elementele lor constitutive (exonii sau regiunile necodante) și se soldează cu schimbarea expresiei genei mutante. Substituirea unei singure baze dintr-un codon atrage după sine modificarea semnificației mesajului respectiv, cu repercusiuni diverse: codificarea altui aminoacid în locul celui normal (cu elaborarea unei proteine mutante cu funcție schimbată), generarea unui codon terminator prematur (și implicit a unei proteine cu lanțul scurtat) sau transformarea unui codon nonsens într-unul cu sens (cu elaborarea unei proteine cu lanț alungit). De exemplu, în structura genei pentru lanțurile β de globină (16), codonul normal (CTC) din poziția 6 codifică pentru acid glutamic. Transformarea sa în TTC (care semnifică lizină) duce la formarea hemoglobinei C (Hb $\alpha_2^A \beta_2^{6Glu\text{-}Lis}$), iar transformarea sa în CAC (mesajul pentru valină) duce la formarea hemoglobinei S (Hb $\alpha_2^A \beta_2^{6Glu\text{-}Val}$). Mutațiile care afectează secvențele reglatoare și intercalare ale genei produc, în funcție de dispunerea lor, alterări ale transcripției, ale maturării sau stabilității ARNm, sau chiar ale translației, și au ca efect comun diminuarea (sau chiar abolirea) sintezei productului respectivei gene. Un astfel de model lezional este descris în βtalasemie (βtal) care are la origine circa 100 de leziuni diferite ale genei pentru lanțurile β de globină (3, 23, 40, 48, 49). Aceste leziuni, în imensa

lor majoritate substituții punctiforme, deleții sau adiții foarte scurte, au fost evidențiate recent în zone care controlează expresia genei (secvențele noncodante 5′ și 3′ joncțiunile dintre exoni și introni), în exoni sau în introni. În esență ele se răsfrâng asupra producției de ARNm. În forma de boală denumită β^+tal elaborarea ARNm normal este scăzută, ceea ce atrage după sine o producție redusă de lanțuri normale de globină. β^0tal se caracterizează prin absența formării unui ARNm funcțional cu abolirea sintezei de βglobină.

În foarte multe situații, substituția unei baze interesează situsurile de clivaj ale unei enzime de restricție și prin aceasta generează polimorfisme de lungime ale segmentelor de ADN (RFLP), detectabile prin *Southern blot*. Cu excepția mutației siclemice care anulează un situs de acțiune al enzimei Mst II și prin aceasta creează un model specific de RFLP care este diagnostic *per se* pentru alela mutantă, celelalte mutații care produc RFLP sunt silențioase fenotipic, deoarece afectează baze noncodante. În aceste situații, mutația care provoacă apariția unui polimorfism este independentă de mutația producătoare de boală și nu este răspunzătoare de apariția acesteia. Aceste polimorfisme sunt generate prin substituții produse, fie în interiorul unei gene (în introni), fie în imediata proximitate a genei și pot servi ca markeri pentru recunoașterea unor mutații patologice. Kan și Dozy au descris primii asocierea unui RFLP cu o boală genetică (22). Ei au secționat ADN-ul uman cu enzima Hpa I, au separat fragmentele și le-au analizat cu o sondă care identifică gena pentru globina β. Gena normală (β^A) a fost identificată într-un fragment de ~7 kb. La repetarea experimentului cu ADN provenit de la bolnavi cu siclemie s-a constatat în 87% din cazuri că gena mutantă (β^S) este găzduită în fragmente de ADN cu lungime de 13 kb. S-a interpretat că diferența constatată ar fi rezultatul apariției mutației S la o persoană la care se produsese în prealabil o mutație silențioasă, care anulase un situs Hpa I, făcând ca fragmentul care conține și gena S să apară mai lung. În exemplul citat, polimorfismul și gena mutantă se asociază de maniera unui haplotip. În astfel de cazuri polimorfismele nu identifică în mod direct indivizii afectați din populația generală, dar sunt diagnostice în contextul unei familii despre care se știe că poartă o genă mutantă care este cuplată cu un anumit RFLP. În alte situații, mutația generatoare de RFLP nu este dispusă în interiorul genei, ci în proximitatea acesteia, dar în același timp este suficient de apropiată pentru a face cvasiimposibilă separarea lor printr-o recombinare. În acest mod cei 2 parteneri apar legați (linked), iar RFLP ajută să se determine distanța relativă care-i separă, ca bază pentru evaluarea modelului care caracterizează un pedigree.

CONTRIBUȚIA GENETICII MOLECULARE LA DIAGNOSTICUL ȘI MONITORIZAREA HEMOPATIILOR MALIGNE

Este bine cunoscut faptul că procesele normale ale diferențierii și maturației celulelor hematopoietice au la bază activări și/sau rearanjări de gene. Aceste procese încep odată cu activarea celulelor stem (CS) multi-

potente. CS pot fi comparate cu bănci de date care stochează întreaga informație genetică. Activarea CS este declanșată de citokine și de alți factori, care operează în diverse combinații. Se concepe că asocierile diferite în factori activatori influențează selectiv aparatul genetic al CS și pe această care induc (sau permit) funcționarea doar a unui pachet limitat de gene. Această selecție stă la originea angajării în diferențiere a CS către una sau alta din cele 8 linii de celule hematopoietice. Angajarea către o linie dată este ireversibilă și este cuplată cu procesul de maturație — un program complex de activări și/sau de rearanjări specifice de gene, care continuă până la formarea celulelor funcționale (mature) ale seriei respective. Expresia decelabilă a acestui program constă din apariția unor caractere fenotipice și specifice (de linie celulară sau de treaptă de maturație), care pot fi evidențiate prin examene morfologice, prin metode imune sau aplicând tehnologia geneticii moleculare, comentată în paragrafele anterioare. Fiecare CS generează o succesiune de celule-fiice în care se regăsesc reproduse caracteristicile celulei de origine (o astfel de fratrie de celule este denumită „clonă"). Hematopoieza normală este policlonală, ordonată și controlată.

La nivel molecular, maturația înseamnă elaborarea acelor producte care asigură funcția celulei. Moleculele specifice se pot acumula în citoplasmă sau sunt exprimate pe suprafața celulei. Unele sunt exprimate tranzitoriu în cursul ontogenezei celulare și definesc o anumită treaptă de maturație, în timp ce altele sunt exprimate de toate celulele unei linii, indiferent de treapta lor de maturație. Această panoplie de molecule a primit numele colectiv de „markeri". Markerii pot fi evidențiați (în sau pe celule) cu anticorpi monoclonali. Metoda se numește imunofenotipare și servește în prezent pentru diagnosticarea precisă a apartenenței unei celule la o serie și la o treaptă de maturație.

Se concepe că bolile maligne hematologice sunt proliferări monoclonale: ele provin din transformarea unei CS. Aceasta păstrează în bună parte proprietățile omoloagelor sale normale: proliferează și se diferențiază dând naștere unei clone de celule descendente. Transformarea malignă poate altera însă programul genetic de maturație al clonei care, în anumite situații (de exemplu în leucemiile acute sau în limfoamele limfoblastice), se poate opri prematur în timp ce în altele (cum ar fi leucemia granulocitară cronică sau mielomul multiplu) se desfășoară complet. Celulele maligne, observate la examenele microscopice de rutină, sunt de fapt celulele „finale" ale acestor modele anormale de hematopoieză: în consecință, fizionomia lor (de celule imature sau mature) și profilul lor imunofenotipic sunt legate decisiv de particularitățile programelor respective de maturație.

Experiența a arătat că nu există un fenotip patognomonic de boală malignă și că în multe cazuri aspectul morfologic al celulelor maligne nu diferă de cel al celulelor omoloage normale. Din aceste motive diagnosticul diferențial între unele proliferări reactive (benigne) ale țesutului hematopoietic și hemopatiile maligne este greu de tranșat doar prin examen morfologic și fenotipare. În acest domeniu, tehnologia moleculară are un aport important în depistarea caracterului monoclonal al proliferării și în definirea bolii maligne prin 2 determinări importante: 1) de-

monstrarea unui model unic de rearanjare a genelor receptorilor pentru antigen ai limfocitelor B și T (RALB și RALT) ca indicator de proliferare monoclonală de linie B sau T și ca marker pentru evaluarea bolii după tratament; 2) demonstrarea bazelor moleculare ale unor translocații asociate specific cu boli maligne hematologice.

1) **Rearanjarea genelor pentru RALB și RALT** este un proces fiziologic care marchează în mod unic ontogeneza limfoidă (vezi cap. XIX „Elemente de citogenetică în hemopatii maligne"). În analizele de laborator cei 2 receptori au semnificație de markeri de linie celulară și sunt exprimați la suprafața membranei celulare. Marea lor variabilitate structurală este explicată prin rearanjarea (regruparea) exonilor care intră în compunerea genelor specifice. În celulele stem aceste segmente codante de genă sunt dispuse liniar („configurație germinativă"). Rearanjarea lor are loc odată cu angajarea în diferențiere: este specifică de linie celulară și unică pentru o celulă progenitoare și pentru clona de celule descendente din aceasta. Diferențierea CS către linia B se însoțește de rearanjarea genelor pentru RALB; un proces similar care implică numai genele. RALT are loc odată cu diferențierea CS către linia T. Ca mecanism general rearanjarea constă din alipirea unor exoni plasați inițial la distanță unul de altul, urmată de excizia porțiunilor intercalare de ADN. Aceasta duce la formarea unei gene noi, care fiind mult mai scurtă decât gena germinală va migra diferit de aceasta în câmpul electric. Analiza acestor diferențe poate fi îndeplinită prin *Southern blot* cu ajutorul unor sonde special concepute.

Materialul de studiu este un extract de ADN preparat dintr-o suspensie celulară (celule ganglionare, medulare sau sanguine) sau din specimene histologice, fracționat cu diverse enzime de restricție. Controlul „negativ" este un extract de ADN placentar în care genele RALB și RALT sunt nearanjate.

Într-o populație policlonală de limfocite B și T fiecare din acestea prezintă rearanjări diferite, iar fragmentele rezultate din digestia enzimatică vor fi extrem de variate și în concentrații prea mici fiecare pentru a produce benzi de migrare detectabile. Într-o populație monoclonală (B sau T) există un model unic de rearanjare care se va exprima printr-o bandă de migrare diferită de cea a benzii de control a modelului germinativ. Într-o populație mixtă, alcătuită din celule policlonale, normale, B și T, printre care sunt amestecate celulele unei clone maligne (B sau T), acestea din urmă pot fi depistate dacă procentul lor este mai mare decât 1% din total (14, 18, 39).

Depistarea monoclonalității unei proliferări limfoide prin analiza moleculară a rearanjării genelor RALB și RALT are o mare importanță diagnostică în situațiile în care metodele convenționale de investigare sunt neeficiente. Ea permite diferențierea bolii maligne de o hiperplazie reactivă benignă, diagnosticul corect al limfoamelor nonhodgkiniene B sau T sau al variantelor B sau T ale leucemiei cu celule păroase, diagnosticul de limfom T periferic în cazurile în care aspectul histologic poate sugera pe cel de boală Hodgkin, evidențierea caracterului monoclonal în limfocitoza cu celule mari granulare (limfoproliferarea cu celule T — gama) și diferențierea ei de alte condiții reactive asemănătoare, încadrarea unor „boli de graniță" (limfadenopatia angio-imunoblastică)

(15). Un avantaj însemnat pentru practică este reprezentat de monitorizarea bolnavilor, metoda aducând date precise pentru: evidențierea bolii minime reziduale, depistarea precoce a recăderilor, precizarea modelului recăderii (reexpansiunea aceleiași clone sau dezvoltarea unei subclone sau a altei clone), aprecierea reușitei unui transplant medular.

2) **Studiul bazelor moleculare ale unor translocații.** Într-un număr de hemopatii maligne, limfoide și mieloide, s-au descris translocații specifice (vezi cap. XIX). Translocațiile produc rearanjări ale genelor care sunt localizate în fragmentele de cromosomi care se permută, cu sudarea genelor plasate la punctele de fractură ale cromosomilor. Aceasta creează noi relații funcționale care modifică expresia cel puțin a uneia dintre genele partenere. Într-o serie de situații, translocațiile implică rearanjarea unor oncogene celulare. Activarea acestor gene normale, în condițiile noului lor habitat, este considerată ca parte importantă în procesul de oncogeneză. Din acest punct de vedere, cel mai bine cunoscute sunt evenimentele moleculare care sunt consecința t(9 : 22) și a t(14 : 18. *t(9 : 22)* este exprimată citogenetic prin cromosomul Philadelphia (Ph_1). Cromosomul Ph_1 a fost descris inițial în 95% din cazurile de leucemie granulocitară cronică (LGC) și, mai recent, într-un procent variabil de cazuri cu leucemii acute (LA) limfoide și mieloide. Cromosomii 9 și 22 se fracturează la nivelul brațelor lungi, în zonele unde sunt plasați locii a 2 gene: protooncogena abl (la 9_q34) și gena BCR_1 (la 22_q11).

Protooncogena abl măsoară 230 kb și conține 11 exoni. Produsul său măsoară 145 kDa (P 145): este o proteină normală a celulelor, cu localizare intracelulară și cu potențial de activitate de tip tirozinkinază (TK) care însă este foarte slab exprimată. Rolul său în celula normală nu este bine înțeles, dar următoarele aspecte par a fi semnificative. TK sunt codificate în mai multe oncogene celulare. Aceste oncoproteine normale catalizează fosforilarea reziduurilor de tirozină din diverse substrate proteice. S-au descris în plus mai mulți receptori pentru factorii de creștere care au activitate TK după atașarea ligandului specific. Mai multe proteine TK elaborate de virusuri oncogene au activitate transformantă *in vitro* sau *in vivo*. Se admite că aceste fosforilări ale tirozinei din substrate proteice intracelulare ar face parte din căile de reglare ale proliferării celulare. Fenomenul este foarte limitat în celulele normale în care fosfotirozina ar reprezenta mai puțin de 1% din totalul fosfoaminoacizilor. Capacitatea tirozinkinazică a P. abl poate fi evidențiată *in vitro* dacă una din tirozinele sale (Tyr 514) este autofosforilată. Acest eveniment nu are loc *in vivo*, unde se constată fosforilarea serinei. Se presupune că fosforilarea tirozinei plasată spre extremitatea COOH a oncoproteinelor celulare ar juca un rol important în reglarea activității TK îndeplinită de ele (37).

Gena BCR_1, este inclusă într-un locus complex în care sunt înșiruite în direcție distală, următoarele gene: $BCR_2 \rightarrow BCR_4 \rightarrow$gena pentru lanțul λ de imunoglobulină $\rightarrow BCR_1 \rightarrow BCR_3 \rightarrow$ oncogena SIS. BCR_1 măsoară circa 100 kb și codifică o proteină de 160 kDa cu funcție necunoscută.

Linia de ruptură a cromosomului 9 taie capătul 5′ al genei abl, proximal de exonul II.

În LGC și LA fracturarea cromosomului 22 are loc în puncte diferite. În LGC linia de ruptură se produce la mijlocul genei BCR, într-o

zonă mică de 5,8 kb, denumită zona bcr *(breakpoint cluster region)*. În urma schimbului reciproc de material produs prin t(9 : 22) are loc fuzionarea segmentului distal al genei abl (care conţine secvenţele ce codifică domeniul TK) cu restul 5′ de genă BCR rămasă pe bontul cromosomului 22. Gena hibridă care rezultă (5′.BCR/abl 3′) se transcrie într-un ARNm hibrid (BCR/abl) de 8,5 kb şi care, la rându-i se traduce într-o proteină de fuziune (NH_3^-.BCR/abl.$COOH^-$) de 210 kDa (P 210). Spre deosebire de P.abl normală, P 210 se dispune în membrana celulară. Are capacitate de autofosforilare spontană şi prin aceasta ar dobândi activitate TK crescută şi potenţial oncogenic. Poate induce transformarea malignă *in vitro* a unor linii celulare şi ar avea un rol important în patogeneza LGC. În cazul LA, t(9 : 22) prezintă alt model de rearanjare. Cromosomul 22 se fracturează cu 100 kb în amonte de zona bcr, la nivelul primului intron al genei BCR_1, la care va fuziona secvenţele abl desprinse din cromosomul 9. Acest tip de genă de fuziune BCR/abl produce un transcript mai scurt (7 kb) în care secvenţele corespunzătoare primului exon al BCR sunt continuate direct cu secvenţele exonului II al genei abl. Proteina hibridă măsoară 185 k (P 185); este o TK mai activă decât P 210 şi este dotată cu un potenţial înalt de transformare (7, 10, 17).

Detectarea rearanjărilor moleculare din cadrul t(9 : 22) este net superioară evidenţierii cromosomului Ph_1 prin examen citogenetic. Evidenţierea modelului discutat al rearanjării genelor este considerată ca un „etalon aur" pentru diagnosticul LGC şi al LA (Ph_1^+). Cercetarea rearanjărilor poate fi întreprinsă la oricare din cele 3 niveluri moleculare: la nivelul genei de fuziune (prin metoda *Southern blot*), la nivelul ARNm himeric (prin *Northern blot*) sau la nivelul proteinelor specifice. De asemenea evidenţierea tulburării moleculare bcr/abl este posibilă şi prin hibridizarea *in situ*. O variantă tehnică de mare performanţă constă în izolarea ARNm specific, recopierea lui într-un fragment de cADN, amplificarea acestuia prin PCR folosind primeri potriviţi (de exemplu: complementari exonilor bcr sau exonului I BCR) şi în final analiza fragmentelor cu sonde specifice.

Analiza moleculară a t(9 : 22) oferă următoarele oportunităţi: 1) precizarea diagnostică a cazurilor de LGC. Ph_1^-: formele de boală cu rearanjare Ph_1^- bcr^+ sunt LGC cu alte variante de translocaţie; formele Ph_1^- bcr^- sunt alte entităţi care mimează LGC (de exemplu, leucemia mielo-monocitară cronică încadrată în prezent în sindromul mielodisplazic); 2) încadrarea corectă a LA.Ph_1^+: formele cu fracturarea cromosomului 22 în zona bcr de 5,8 kb sau în care se detectează transcriptul ARNm de 8,5 kb sunt cazuri de LGC nediagnosticate în perioada fazei cronice sau accelerate; formele în care rearanjarea se face în amonte de bcr sau în care se evidenţiază ARNm hibrid de 7 kb sunt LA *de novo;* 3) monitorizarea evoluţiei postterapeutice (persistenţa rearanjării chiar în condiţiile dispariţiei cromosomului Ph_1 — aşa-numita remisiune citogenetică — semnifică menţinerea clonei sau boala minimă reziduală); 4) diagnostic retroactiv — pentru elucidarea unor cazuri controversate, prin extragerea ADN din celule întinse pe lamă (11).

t(14; 18) este trăsătura citogenetică a limfoamelor foliculare şi induce rearanjări moleculare implicate în limfomogeneză. Cromosomii 14

și 18 se fracturează la nivelul brațelor lungi în dreptul locilor a 2 gene: gena lanțului greu (H) de imunoglobulină (la 14_q32) și oncogena bcl 2 („B — *cell leukaemia/lymphoma* — 2") plasată la 8_q21.

Structura complexă a *genei lanțului H* a fost evocată în secțiunea anterioară a acestui capitol. În condiții fiziologice rearanjarea genei H are loc foarte timpuriu, în stadiul denumit „pre-B" al ontogenezei. Translocația survine în primă etapă a rearanjării genei. Fragmentul de genă H care rămâne pe cromosomul 14 conține în cuprinsul său secvența enhancer.

Gena bcl-2 are o structură simplă (3 exoni+2 introni). Ea codifică o proteină a membranei mitocondriale, de 25 kd, care acționează ca blocant al apoptozei (procesul homeostatic normal prin care este programată moartea celulară) (20). Acțiunea aceasta a proteinei bcl-2 este independentă de proliferarea celulară. Punctele de rupere ale genei tind să se aglomereze în 2 zone plasate în aval de porțiunile sale codante: una majoră („mbr" — *major breakpoint cluster region),* asociată cu 50—75% din cazuri și cealaltă minoră („mcr" — *minor breakpoint cluster region),* consemnată în 20—40% din cazuri.

În urma translocației se formează pe cromosomul 14 o genă hibridă bcl-2/H. Prin aceasta secvențele codante ale oncogenei intră sub influența enhancerului genei H. Efectul fuzionării este mărirea producției proteinei bcl-2, ceea ce conferă o mare longevitate celulelor mutante din care rezultă un avantaj de creștere propice apariției și a altor anomalii cromosomiale adiționale și transformării limfomului (8, 9, 29).

Depistarea genei de fuziune bcl-2/H este posibilă prin metoda *Southern blot* cu ajutorul unor baterii de sonde specifice: pentru fiecare din endonucleazele folosite, fragmentele de ADN rearanjate au altă mărime decât fragmentele corespunzătoare nearanjate (care conțin respectivele secvențe nucleotidice sub formă germinativă). În plus, este posibilă și amplificarea lor prin PCR, deoarece s-au construit primerii specifici pentru mbr, mcr și pentru secvența H din proximitatea punctului de fuziune.

Analiza moleculară a rearanjării bcl-2/H a devenit metoda de referință pentru situațiile în care materialul de studiu este limitat la eșantioane mici (de exemplu după puncție aspiratorie cu ac fin) sau atunci când tehnicile curente de diagnostic (examenul morfologic, imunofenotiparea și citogenetica) nu permit concluzii certe. Fiecare clonă malignă exprimă o tipologie unică a dimensiunilor și a migrabilității benzilor de restricție (la analiza Southern); în mod identic, mărimea fragmentelor multiplicate prin PCR demonstrează același gen de particularitate individuală. Datorită acestor caractere, rearanjarea capătă semnificația unui „document de identitate" pentru fiecare caz luat în parte, iar evidențierea sa se dovedește utilă într-o varietate de situații: depistarea localizărilor intramedulare discrete în cursul procedurii de stadializare/restadializare, confirmarea reziduală la sfârșitul unui program de terapie, evidențierea precoce a determinărilor la nivelul sistemului nervos central sau al seroaselor, detectarea recăderilor din etapa subclinică, evaluarea pacienților după grefă de măduvă osoasă (8, 9, 7).

IMPACTUL METODELOR DE ANALIZĂ MOLECULARĂ ASUPRA DIAGNOSTICULUI CLINIC ŞI PRENATAL AL UNOR BOLI HEMATOLOGICE EREDITARE

În general, bolile ereditare au 4 caractere de bază: pot fi determinate de alterarea unei singure gene sau de modificări produse în mai mulţi loci; pot fi efectul unor mutaţii ale autosomilor sau ale gonosomilor; se pot transmite pe parcursul generaţiilor la mai mulţi membri ai unui pedigree sau pot apărea la un individ printr-o mutaţie *de novo;* se pot manifesta clinic după naştere sau mai târziu în cursul vieţii. Din aceste motive estimarea riscului de transmitere, identificarea cărăuşilor şi diagnosticul prenatal constituie obiective de cea mai mare importanţă pentru profilaxia acestor afecţiuni.

Progresele din domeniul tehnologiilor moleculare au contribuit substanţial la dezvoltarea studiilor asupra bolilor genetice hematologice şi în mod specific asupra bolilor provocate de o mutaţie într-o singură genă.

Diagnosticul prenatal al bolilor genetice, prin analiză moleculară, necesită întrunirea a 3 elemente: posibilitatea recoltării unui material de studiu adecvat — cu riscuri minime pentru mamă şi pentru făt, cunoaşterea caracteristicilor leziunii moleculare care provoacă boala şi existenţa instrumentelor adecvate de lucru (sonde şi/sau primeri specifici).

Deoarece la un individ dat toate celulele somatice (cu excepţia limfocitelor) conţin molecule identice de ADN, orice celulă de provenienţă fetală este adecvată pentru studiu. Tehnica iniţială de obţinere a celulelor fetale a fost amniocenteza. Recoltarea lichidului amniotic poate fi întreprinsă după cea de-a 18-a săptămână de gestaţie, iar întreaga procedură de analiză durează încă 4 săptămâni. Din aceste motive, i se preferă în prezent aspirarea de vilozităţi coriale cu ajutorul unui cateter moale care este trecut prin colul uterin sub ghidare ultrasonografică. Vilozităţile coriale conţin numeroase celule în mitoză care, în sens generic, exprimă genomul fetal. Recoltarea este posibilă încă de la finele primului trimestru al sarcinii (săptămânile 8—12), cu riscuri minore [circa 4,1% pierderi de sarcină după manevră (Jackson, 1985; citat de 44)].

În analiza probelor, geneticianul are în faţă 2 posibilităţi de descoperire a unei anomalii moleculare: cercetarea directă a genei implicate sau evidenţierea existenţei unui anumit model de RFLP care este asociat cu gena patologică. În tabelul 17.II sunt prezentate schematic modele conjuncturale care pot fi întâlnite în practică.

În primul model este posibilă detectarea directă a mutaţiei prin *Southern blot* (fără a necesita studierea membrilor familiei sau prezenţa unui RFLP) cu ajutorul anumitor endonucleaze, deja probate, care separă din ADN-ul subiectului fragmente ce conţin secvenţa anormală şi cu acela al unor sonde special construite care hibridizează numai cu secvenţă mutantă şi nu „recunosc" secvenţa normală a genei. Prin această metodă se poate depista siclemia (6), hemoglobinoza C (46) şi unele tipuri de β talasemie care apar frecvent răspândite în bazinul mediteranean (36). Reamintim situaţia specială a mutaţiei siclemice, care poate fi evidenţiată atât *direct,* prin procedura semnalată mai sus sau prin utilizarea endonu-

cleazei Mst II cât și *indirect* prin demonstrarea lincării mutației cu un RFLP după digestie cu Hpa I (34, 38).

În cel de-al 2-lea model, leziunea genei este o deleție parțială sau completă și investigatorul are la dispoziție sonde specifice. Tehnica de studiu este *Southern blot* cuplată eventual cu PCR. Metoda servește pentru detectarea formelor de talasemie α și β produse în urma unor deleții (21, 33).

TABELUL 17.II

Elemente practice care ghidează diagnosticul molecular al hemopatiilor cu transmitere genetică (39, 44)

Modelul asocierilor	Gena	Tipul de leziune genetică	Existența sondelor specifice	Asocierea unui RFLP	Metode
1.	Cunoscută	Mutație	Da	Nerelevant	Testare directă cu endonucleaze + SB (±PCR); hibridizare + SB
2.	Cunoscută	Deleție	Da	Idem	Detectarea deleției cu sonde specifice + SB
3.	Cunoscută	Nerelevantă	Da	Da	Analiza RFLP (±PCR); SB

SB = *Southern blot*
RFLP = *restriction lenght fragment polymorphism*
PCR = *polymerase chain reaction*

În modelul 3, baza evidențierii mutației genei este demonstrarea existenței asocierii acesteia cu un RFLP. Acesta joacă rol de marker al genei patologice. Dacă, de exemplu, unul din părinți este purtătorul unei tare asociată cu un RFLP, descoperirea acestuia la produsul de concepție evidențiază indirect transmiterea genei patologice. Evidențierea transmiterii bolii prin intermediul RFLP este utilă în situațiile în care leziunea genei nu este bine precizată sau este foarte complexă. În acest mod s-au identificat 11 haplotipuri asociate cu gena β globinei, la persoane cu β talasemie (35) sau transmiterea hemofiliei B (39).

BIBLIOGRAFIE

1. ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J. și colab.: Molecular biology of the cell, Garland Publishers, New York, Londra, 1983.
2. ALWINE J. C., KEMP D. J., STARK G. R.: Proc. Natl. Acad. Sci. 1977; 74.
3. BENZ E. J. Jr., FORGET B. G.: Ann. Rev. Med. 1982; 33: 363.
4. BENZ E. J. Jr.: Anatomy and physiology of the gene. În: Hoffman R., Benz E. J. Jr., Shattil S. J. et al. (eds.): Hematology: basic principles, Edit. Churchill. Livingstone, New York, 1991.
5. CARLSON E. A.: Human genetics. Lexington Mass, D. C. Heath and Comp., 1984.
6. CONNER B. J., REYES A. A., MORIN C. și colab.: Proc. Natl. Acad. Sci. 1983; 80: 278.
7. CRIȘAN D., CARR E. R.: Laboratory Medicine 1992; 23: 730.

8. CRIȘAN D., ANSTETT M. J.: Medicine 1993; 24: 579.
9. CRIȘAN D.: Clin. Chem. News 1993; 19: 60.
10. CRIȘAN D.: Molec. Biol. Pathol. 1993; 103.
11. CRIȘAN D., MATTSON J. C.: DNA Cell Biol. 1993; 12: 455.
12. DIDZUN D.: Medical Focus 1992; 4: 28.
13. EDWARDS A. M., HUNTER S. V., HONKIN R. C.: Laboratory Med. 1993; 24: 629.
14. FARKAS D. H.: Laboratory Med. 1992; 23: 723.
15. FELLER A. C., GREISSER H., SCHILLING C. V. și colab.: Amer. J. Pathol. 1988; 133: 549.
16. FORGET B. D.: Ann. Intern. Med. 1979; 91: 605.
17. HAGEMEYER A.: Baillière's Clin. Haematol. 1987; 1: 963.
18. HANSON C. A.: Laboratory Med. 1993; 24: 562.
19. HARTL D., FREIFELDER D., SNYDER L. A.: Basic genetics, Jones & Bartlett Publishers, Boston, 1988.
20. HOCKENBERY D., NUNEZ G., MILLIMAN C. și colab.: Nature 1990; 348: 334.
21. KAN Y. W., GLOBUS M. S., DOZY A. M.: New Engl. J. Med. 1976; 295: 1165.
22. KAN Y. W., DOZY A. M.: Lancet 1978; 2: 910.
23. KAZAZIAN H. H., BOEHM C. D.: Blood 1988; 72: 1107.
24. KRICKA I. J.: Nonisotopic DNA probes techniques, Academic Press, San Diego, 1992.
25. LAWN R. M.: Molecular genetics of factor VIII deficiency. În Hoffman R., Benz E. J. Jr., Shattil S. J. et al. (eds.): Hematology: basic principles, Edit. Churchill-Livingstone, New York, 1991.
26. LOEB L. A., KUNKEL T. A.: Rev. Biochem. 1982; 52: 429.
27. MAXAM A. M., GILBERT W.: Proc. Natl. Acad. Sci. 1977; 74: 560.
28. MAXIMILIAN C., IOAN D. M.: Dicționar enciclopedic de genetică. Edit. științifică, București, 1984.
29. McKEITHAN T. W.: Semin. Oncology 1990; 17: 30.
30. MULLIS K. B.: Scientific American 1990; 36.
31. MULLIS K., FALOONA F., SCHARF S. și colab.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1985; 51: 263.
32. NEUMANN R., LIEDHEGENER O.: Lab. Medica 1988; 4: 13.
33. ORKIN S. H., ALTER B. P., ALTAY C. și colab.: New Engl. J. Med. 1978; 299: 166.
34. ORKIN S. H., LITTLE P. F. R., KAZAZIAN H. H. Jr. și colab.: New Engl. J. Med. 1982; 307: 32.
35. ORKIN S. H., KAZAZIAN H. H. Jr., ANTONARAKIS S. E. și colab.: Nature 1982; 296: 627.
36. ORKIN S. H., MARKHAM A. F., KAZAZIAN H. H. Jr.: J. Clin. Invest. 1983; 71: 775.
37. PENDERGAST A. M., WITTE O. N.: Baillière's Clin. Haematol. 1987; 1: 1001.
38. PHILLIPS J. A. III, SCOTT A. F., KAZAZIAN H. H. Jr. și colab.: J. Hopkins Med. J. 1979; 145: 57.
39. PIPER M. A., UNGER E. R.: Nucleic acid probes, ASCP Press, Chicago, 1989.
40. PIRASTU M., KANY Y. W., CAO A. și colab.: New Engl. J. Med. 1983; 309: 284.
41. PTASHNE M.: Nature 1988; 335: 683.
42. ROWLEY R. T., BENZ E. J. Jr., MIENHUIS A. W.: Molecular genetics for the hematologist. În Fairbanks V. F. (ed.): Current hematology and oncology, vol. 4. Year Book Med. Publishers Inc., Chicago, 1986.
43. SANGER F., NICKLEN S., COULSON A. R.: Proc. Natl. Acad. Sci. 1977; 74: 5463.
44. SHAPIRO L. J., COMINGS D. E., JONES O. W. și colab.: Ann. Intern. Med. 1986; 104: 527.
45. SOUTHERN E. M.: J. Mol. Biol. 1975; 98: 503.

46. STUDENCKI A. B., CONNER B. J., IMPRAIM C. C. și colab.: Am. J. Hum. Genet. 1985; 37: 42.
47. THOMPSON J. S., THOMPSON M. W.: Genetics in medicine, W. B. Saunders Comp., Philadelphia, 1986.
48. WACJMAN H., LANTZ B., GIROT R.: Les maladies du globule rouge. Flammarion, Paris, 1992.
49. WINTER W. P., CASTRO O.: Hemoglobinopathies and thalassemias. În Fairbanks V. F. (ed.): Current hematology and oncology, vol. 4. Year Book Med. Publishers Inc., Chicago, 1986.
50. WRIGHT A. F.: J. Clin. Pathol. 1986; 39: 1281.

XVIII

IMPLICAȚIILE GENETICII MENDELIENE ÎN HEMATOLOGIE

S. NICOARĂ, ANDREEA MOICEAN

INTRODUCERE

Organismul uman este constituit din aproximativ o sută de trilioane (10^{14}) de celule. Acest număr imens de celule provine din 50 runde de diviziuni succesive dintr-o singură celulă: z i g o t u l* (6, 23).

În ADN-ul din nucleul zigotului este înscrisă, ca pe o bandă de magnetofon, toată informația necesară dezvoltării complete a organismului (diviziunea și diferențierea celulelor, asamblarea celulelor în țesuturi și organe, sinteza diverselor proteine și enzime etc.) (3).

Informația stocată în ADN este transmisă de la nucleu la organitele din citoplasmă; de la zigot la trilioanele de celule somatice; de la celulele somatice, prin g a m e ț i, la zigoții generațiilor succesive. ADN are un rol fundamental în procesul vieții (31), el fiind materialul genetic specific. El este constituit din unități elementare, capabile să transmită un mesaj genetic, numite g e n e.

S-a estimat că în nucleul unei celule somatice în interfază firul de ADN are o lungime de 174 cm. În cursul m i t o z e i firul de ADN se condensează de aproximativ 10 000 de ori și formează în metafază organite nucleare, numite c r o m o s o m i (6, 31). Informația ereditară este distribuită în 23 perechi de cromosomi. Fiecare membru al unei perechi de cromosomi provine de la un gamet. Fiecare cromosom conține mii de gene, dispuse linear.

Descifrarea mecanismelor prin care informația stocată în ADN este codificată, transmisă, diversificată și exprimată somatic și biochimic face obiectul de studiu al unei științe numită genetică (2, 3).

* Termenii care apar cu litere drepte spațiate sunt definiți în glosarul care se găsește la sfârșitul acestui capitol.

ISTORIC

Genetica a apărut, ca știință experimentală, în a doua jumătate a secolului al XIX-lea. În acea perioadă, în biologie era larg răspândită ideea amestecului caracterelor moștenite de la părinți.

În 1866, Gregor Mendel a prezentat rezultatele unei serii mari de experimente de încrucișare a unor linii pure de mazăre de grădină *(Pisum sativum)*. Pe baza acestor rezultate, el a formulat *trei legi ale eredității*. Aceste legi sunt: 1) *unitatea de ereditate:* caracterele parentale își mențin identitatea și nu se amestecă la descendenți; chiar dacă nu se exprimă în prima generație, ele reapar nemodificate în generațiile următoare; 2) *segregarea:* cei doi membri ai unei perechi de factori ereditari nu se găsesc simultan în același gamet, ci se separă și trec în gameți diferiți; 3) *asortarea independentă:* membrii diferitelor perechi de factori ereditari se asortează în gameți independent, la întâmplare (31).

La începutul secolului al XX-lea a fost dovedită natura universală (la plante, animale și la oameni) a legilor lui Mendel. În 1902, Garrod a comunicat un prim exemplu de ereditate mendeliană la om: alcaptonuria. Garrod este unul din fondatorii *geneticii medicale*.

Experimentele de încrucișare inițiate de Mendel au dominat cercetarea în genetică până la mijlocul secolului al XX-lea. Ele au primit denumirea de *genetică de transmitere* sau *genetică mendeliană*. Genetica mendeliană a mai fost numită și genetica pre-ADN, întrucât regulile care o guvernează pot fi înțelese fără cunoașterea naturii biochimice a genelor și a produselor genelor (17).

EREDITATEA MONOGENICĂ SAU MENDELIANĂ

Marea contribuție în genetică (și în biologie, în general) a lui Gregor Mendel a fost recunoașterea unor factori ereditari (numiți ulterior gene) care, în cursul transmiterii de la o generație la alta, se supun unor legi statistice. În acest fel a devenit posibilă identificarea unor caractere sau boli cu ereditate monogenică sau mendeliană (19).

Bolile cu ereditate monogenică sau mendeliană sunt produse de *gene mutante*, situate pe un singur l o c u s pe unul sau ambii membri ai unei perechi de cromosomi. Tulburarea de bază este o eroare majoră, unică în informația genetică. Aceste boli respectă legile mendeliene de transmitere, adică au pedigree-uri caracteristice (31).

Un exemplu hematologic de boală monogenică este siclemia (36). În această boală mutația unui singur nucleotid (de la CTC la CAC) are ca urmare înlocuirea unui aminoacid (acidul glutamic cu valină) în lanțul beta al Hb și apariția unei Hb anormale (Hb S). Această proteină anormală unică stă la baza unor semne clinice aparent fără legătură (anemie hemolitică, tromboze vasculare, nefropatie, osteomielită etc.). Pe scurt: un ADN anormal, un aminoacid crucial dislocat, un individ bolnav.

În ereditatea monogenică fiecare caracter moștenit este determinat de două gene (de exemplu, A și a), una paternă și alta maternă. Diversele forme ale unei gene se numesc a l e l e. Dacă cele 2 gene sunt similare

(de exemplu, AA sau aa) individul este homozigot pentru caracterul respectiv. Dacă cele 2 gene sunt diferite (de exemplu Aa) individul este heterozigot pentru caracterul respectiv. Caracterul care se exprimă atât la homozigoți cât și la heterozigoți se numește dominant, iar dacă el se exprimă numai la homozigoți, se numește recesiv.

Bolile monogenice au patru tipuri de transmitere ereditară: 1) autosomală dominantă; 2) autosomală recesivă; 3) dominantă legată de cromosomul X și 4) recesivă legată de cromosomul X. Sunt cunoscute peste 4 000 de tulburări cu ereditate monogenică. McKusick (21) le-a clasificat astfel: >2 200 autosomale dominante, >1 400 autosomale recesive și >200 legate de cromosomul X.

Bolile cu ereditate poligenică sau plurifactorială, în contrast cu bolile monogenice, sunt produse de combinația unor variații genice mici, la care se pot adăuga și factori de mediu. Ele pot să prezinte aglomerări familiale, dar nu au pedigree-uri caracteristice. Exemple de boli cu ereditate poligenică sunt: hipertensiunea esențială, coronaropatiile, cardiopatiile congenitale și schizofrenia (36).

Bolile poligenice nu trebuie să fie confundate cu heterogenitatea genetică din bolile monogenice.

Heterogenitatea genetică se referă la faptul că mai multe mutații genice pot să producă sindroame clinice identice sau similare. Aceste mutații pot să intereseze *gene alelice,* situate într-un singur locus genetic sau *gene non-alelice,* situate în loci diferiți.

Menționăm trei exemple de heterogenitate genetică în hematologie: 1) variantele multiple ale G_6PD (>300) reprezintă mutații genice structurale diferite, care apar într-un singur locus; 2) hemofilia are la bază mutații ale doi loci distincți, situați pe cromosomul X: unul care duce la deficitul de factor VIII (hemofilia A) și altul care duce la deficitul de factor IX (hemofilia B); 3) methemoglobinemia ereditară poate fi produsă de cel puțin 10 mutații diferite în trei loci distincți: doi la locusul pentru lanțul alfa al Hb, trei la locusul pentru lanțul beta al Hb și cel puțin cinci la locusul pentru NADH methemoglobin reductaza; astfel, această boală este un exemplu de heterogenitate genetică complexă, atât alelică cât și non-alelică (36).

EREDITATEA AUTOSOMALĂ DOMINANTĂ

Definiție. Ereditatea autosomală dominantă (AD) este un mod de ereditate legat de genele de pe cromosomii autosomali (perechile 1—22), iar caracterele dominante au o expresie clinică completă atât în prezența unei singure gene anormale (starea de heterozigot) cât și în prezența a două gene anormale (starea de homozigot).

Criterii. În fig. XVIII.1 apare pedigree-ul stereotip pentru acest mod de ereditate (31).

1) Boala apare în toate generațiile (I—III) și fiecare bolnav (II — 3, 6, 7 și III — 4, 6, 8, 10) are un părinte afectat („ereditate verticală") (19).

2) Fiecare copil al unei persoane afectate are riscul de a moşteni boala de aproximativ 50%. Dar, formarea fiecărui zigot este statistic un fenomen independent, aşa încât într-o familie individuală poate exista o mare variaţie de la raportul 1 : 1.

3) Copiii normali (II — 2) ai unei persoane afectate (I — 2) nu transmit boala la descendenţi (III — 1, 2, 3).

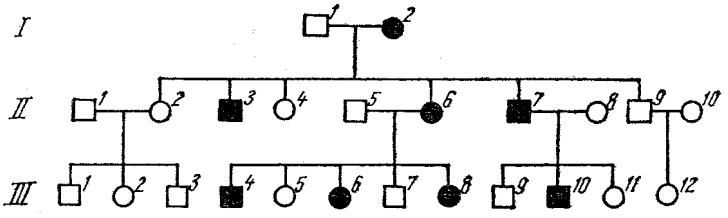


Fig. XVIII.1. — Pedigree stereotip pentru ereditatea autosomală dominantă; de remarcat: „tipul vertical" de ereditate şi transmiterea de la tată la fiu (II-7 la III-10) (31); pătrat gol: bărbat normal; pătrat plin: bărbat bolnav; cerc gol: femeie normală; cerc plin: femeie bolnavă.

4) Apariţia şi transmiterea bolii nu sunt influenţate de sex, adică ♂ şi ♀ pot fi afectaţi în număr aproximativ egal şi pot transmite boala la descendenţi indiferent de sex. Este posibilă transmiterea directă ♂—♂ (II — 7 la III — 10).

5) Expresia clinică este variabilă şi debutul poate să apară la o vârstă înaintată (36).

Variaţii. Între proporţiile teoretice şi cele constatate în practică pot să existe diferenţe. La criteriul 1 se menţionează trei excepţii: 1) o nouă mutaţie; 2) insuficienţa de penetraţie şi 3) variabilitatea de expresivitate, iar la criteriul 3 insuficienţa de penetraţie (31).

BOLI HEMATOLOGICE CU EREDITATE AUTOSOMALĂ DOMINANTĂ

Telangiectazia hemoragică ereditară se transmite ca o tulburare autosomală dominantă. Sexele sunt afectate în proporţii egale. Starea homozigotă poate să fie letală.

Ancheta familială a unui caz internat în Clinica de hematologie din Bucureşti ne-a arătat că din 31 de membri, repartizaţi în trei generaţii, 9 au făcut această boală hemoragică (22). Wintrobe a prezentat arborele genealogic al unuia din pionierii Utahului, care a fost poligam şi care a transmis boala la 81 din 410 descendenţi de-a lungul a 6 generaţii succesive.

Disfibrinogenemia congenitală. La majoritatea familiilor cu această boală s-a descris un mod de transmitere autosomal dominant.

Sindromul Alport este un sindrom rar, caracterizat prin nefrită, surditate de percepţie şi anomalii ale cristalinului. Are un mod de transmi-

tere autosomal dominant (16). A. Coliță și colab. (8) au analizat o familie cu sindrom Alport asociat cu trombocitopenie și megatrombocite al cărei pedigree a arătat un mod de transmitere autosomal dominant.

Angioedemul ereditar este un sindrom rar, care are la bază deficitul unei glicoproteine plasmatice (inhibitorul C_1) cu rol de reglare enzimatică în interacțiune cu plasmina, kalikreina, F XI a și F XII a (13). Acest sindrom are o ereditate autosomală dominantă (36). Un caz a fost diagnosticat în Clinica de hematologie din București (15).

EREDITATEA CODOMINANTĂ ÎN HEMATOLOGIE

Dacă ambele alele ale unei perechi de gene au o expresie completă la heterozigoți, ele se numesc c o d o m i n a n t e.

Unul din cele mai bune exemple de codominanță este sistemul de grupe sanguine AB0, Alelele I^A și I^B determină sinteza pe suprafața eritrocitelor a două polizaharide distincte, respectiv A și B. A treia alelă I^0, care este recesivă, nu determină sinteza nici a polizaharidului A și nici B. Un individ homozigot recesiv I^0 I^0 produce eritrocite, cărora le lipsesc ambele polizaharide și este de grupă sanguină 0. Un individ homozigot I^A și I^A are grupa sanguină A. Un individ homozigot I^B I^B sau heterozigot I^B I^0 are grupa sanguină B. Un individ heterozigot I^A I^B are pe eritrocite ambele polizaharide A și B și ca atare are grupa AB. Acest individ heterozigot ilustrează codominanța (17).

Sistemul AB0 are trei alele, și anume I^A, I^B și I^0. Fiecare pereche de alele poate să reprezinte un genotip. Deci, sistemul AB0 ilustrează și *alelismul multiplu* (17).

Exemple de ereditate codominantă în patologia hematologică sunt *hemoglobinopatiile* atât cele calitative (exemplu: *siclemia)* cât și cele cantitative (exemplu: *sindroamele talasemice).* Caracteristic este faptul că la heterozigoți ambele alele (și cea normală și cea patologică) se exprimă fenotipic. Mai precis, în eritrocite se găsește atât Hb normală cât și Hb patologică (26).

În figura XVIII.2 se prezintă schematic sinteza Hb în siclemie la un heterozigot și la un homozigot. Heterozigotul are o genă structurală β normală și una mutantă (β*). În acest caz se vor sintetiza atât catene β^A (normale), cât și catene β^S (mutante). Acestea împreună cu catenele α^A vor forma Hb.A și respectiv Hb.S (fig. XVIII.2.I). Genotipul unui astfel de bolnav se va scrie $\frac{\alpha^A \beta^S}{\alpha^A \beta^A}$, iar fenotipul HbAS. Homozigotul are ambele gene β mutante (β*) și întreaga cantitate de Hb este anormală (fig. XVIII.2 II). Genotipul unui astfel de bolnav se va scrie $\frac{\alpha^A \beta^S}{\alpha^A \beta^S}$, iar fenotipul HbSS.

În figura XVIII.3 se prezintă schematic sinteza Hb la un dublu heterozigot cu două gene structurale mutante diferite. Dacă localizarea este pe aceeași catenă se vor produce două Hb anormale ($\alpha_2\beta^+$ și $\alpha_2\beta_2^*$) (fig. XVIII.3 I). Un bolnav cu o genă mutantă α(α⁺) și o genă mutantă β(β*) produce patru tipuri de Hb: o Hb A și trei Hb anormale ($\alpha_2\beta_2^*$, $\alpha_2^+\beta_2$ și $\alpha_2^+\beta_2^*$) (fig. XVIII.3. II).

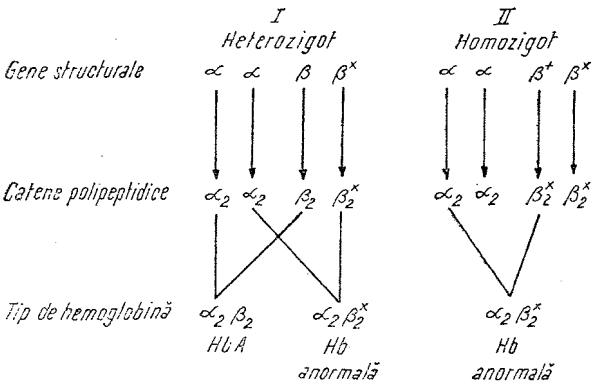


Fig. XVIII.2. — Sinteza Hb la un heterozigot (I) și la un homozigot (II) cu anomalii pe catena β; * indică gene anormale și catene polipeptidice ale globinei anormale structural.

Exemple de dublu heterozigoți sunt: asocierea dintre gena de siclemie și gena de βtalasemie ($\alpha_2\beta^S\beta$thal) sau asocierea dintre gena de siclemie și gena de Hb C ($\alpha_2\beta^S\beta^C$). Această categorie de bolnavi poartă numele și de compuși heteroalelici (36).

În ceea ce privește modul de transmitere, un cuplu format dintr-un părinte heterozigot și un părinte normal are probabilitatea să producă 50% descendenți normali și 50% heterozigoți (fig. XVIII.4, I). Un cuplu cu ambii părinți heterozigoți (pentru aceeași anomalie) va produce 25% normali, 50% heterozigoți și 25% homozigoți (fig. XVIII.4, II). Pericolul căsătoriei dintre doi heterozigoți (de exemplu cu talasemie minoră) este probabilitatea ca 1/4 din copii să fie homozigoți.

EREDITATEA AUTOSOMALĂ RECESIVĂ

Definiție. Ereditatea autosomală recesivă (AR) este un mod de ereditate legat de genele de pe cromosomii autosomali (perechile 1—22), iar caracterele recesive au o expresie clinică completă numai în prezența a două gene anormale (starea de homozigot).

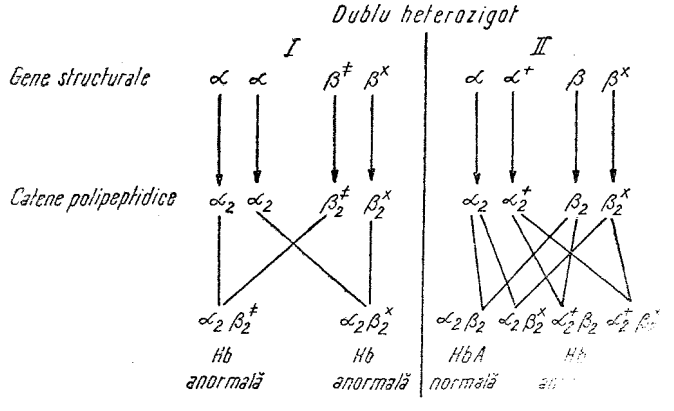


Fig. XVIII.3. — Sinteza Hb la un dublu heterozigot cu două gene structurale mutante diferite; I: localizare pe aceeași catenă; II: localizare pe două catene diferite.

Criterii. În figura XVIII.5 apare pedigree-ul stereotip pentru acest mod de ereditate (31).

1) Boala apare într-o singură generație, la frați și surori, dar nu la părinți, descendenți sau alte rude („ereditate orizontală") (19).

2) În cazul unirii a doi heterozigoți (III — 3×III — 4) există probabilitatea să se nască 25% copii normali (IV — 1), 50% heterozigoți, purtători (IV — 2 și 3) și 25% homozigoți, bolnavi (IV — 4).

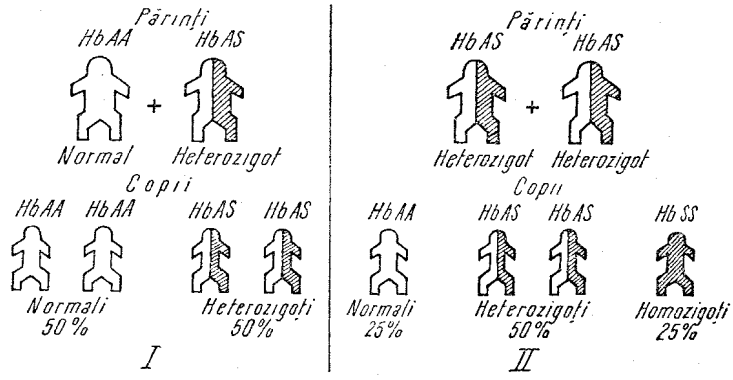


Fig. XVIII.4. — Model de transmitere genetică a siclemiei, când unul din părinți este normal și celălalt heterozigot (I) și atunci când ambii părinți sunt heterozigoți (II).

3) Cu cât este mai rară gena mutantă în populație, cu atât este mai mare probabilitatea ca individul bolnav să fie produsul unor părinți consanguini.

4) Bărbații și femeile au șanse egale de a fi afectați.

BOLI HEMATOLOGICE CU EREDITATE AUTOSOMALĂ RECESIVĂ

Majoritatea deficitelor enzimatice, care stau la baza anemiilor hemolitice nesferocitare ereditare, au un mod de transmitere autosomal recesiv. Exemplul clasic este deficitul de piruvat kinază.

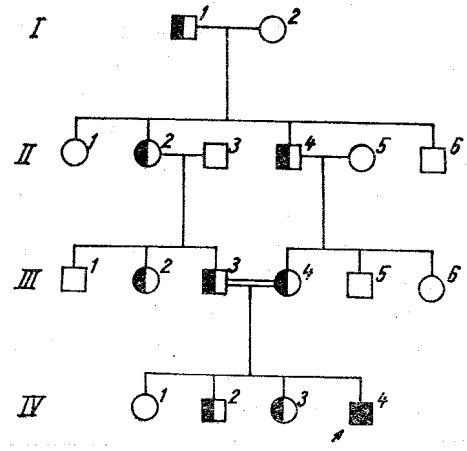


Fig. XVIII.5. — Pedigree stereotip pentru ereditatea autosomală recesivă; prin consanguinitate (III-3×III-4) s-au „întâlnit" două gene recesive și a rezultat un homozigot, afectat (IV-4) (↗) (31); pătrat jumătate plin: bărbat heterozigot (purtător); pătrat plin: bărbat homozigot (bolnav); cerc jumătate plin: femeie heterozigotă (purtătoare); cerc plin: femeie homozigotă (bolnavă).

Deficitul de piruvat kinază. Există o mare heterogenitate moleculară a variantelor de piruvat kinază. Consanguinitatea este rară. Dar, majoritatea subiecților afectați sunt „heterozigoți compuși" cu amestecuri de cel puțin două izoenzime mutante (24).

Piropoikilocitoza ereditară (PPE) este o tulburare rară, strâns legată de eliptocitoza ereditară. Are un mod de transmitere autosomal recesiv. S-au descris bolnavi cu PPE, care erau dublu heterozigoți pentru două mutații de α spectrină (25). Un caz de PPE a fost diagnosticat în Clinica de hematologie din București (32).

Trombastenia Glanzmann (deficitul de glicoproteină II b/III a) se transmite ca o tulburare autosomală recesivă. Genele pentru glicoproteinele II b și III a se găsesc localizate în vecinătate („linked") pe o porțiune a brațului lung al cromosomului 17 (17q 21—23). După prezența sau absența complexelor II b/III a pe suprafața trombocitelor, trombastenia poate fi clasificată în variante + sau 0. După localizarea defectelor pe genele II b sau III a se poate face o nouă clasificare în varianta II b^+/II b^0 sau III a^+/III a^0 (1).

Sindromul Bernard-Soulier (deficitul de glicoproteină I b/IX) se moștenește ca o tulburare autosomală recesivă. Consanguinitatea este comună, reflectând raritatea acestei tulburări. Gena pentru I b α este localizată pe cromosomul 17, gena pentru I b β pe cromosomul 22, iar gena pentru IX pe cromosomul 3. A fost determinată structura pentru gena I b/α. La heterozigoți s-a găsit un conținut în glicoproteina I b intermediar între normali și subiecții afectați (1).

Cea mai mare parte din *coagulopatiile ereditare* (deficitele de F I, F V, F VII, F X, F XI, și F XIII) au o ereditate autosomală recesivă (29). Fac excepție deficitele de F VIII și de F IX (hemofiliile), care se transmit ca tulburări legate de cromosomul x.

Deficitul de F I (afibrinogenemia și hipofibrinogenemia) produce un sindrom hemoragic care, clinic, este similar cu hemofiliile. Totuși, boala se transmite ca un caracter autosomal recesiv. Sunt afectate ambele sexe. La aproximativ jumătate din familii se găsește o consanguinitate. Subiecții afectați sunt homozigoți pentru acest deficit. Hipofibrinogenemia este considerată starea heterozigotă a afibrinogenemiei.

Deficitul de F V se moștenește ca un caracter autosomal recesiv. Frecvența genei a fost estimată la $5—10 \times 10^{-4}$. Consanguinitatea este comună în familiile cu pacienți afectați.

Deficitul de F VII se moștenește ca un caracter autosomal recesiv. Incidența deficitului de F VII este de 1 la 500 000.

Deficitul de F X (factorul Stuart-Prower) se transmite ca un caracter autosomal recesiv. Incidența deficitului de F X este de 1 : 500 000. S-a semnalat consanguinitatea, inclusiv în familia bolnavului american Stuart, a cărui mamă și tată erau mătușă și nepot.

Deficitul de F XI. Pacienții pot fi împărțiți în două categorii: prima cu deficit major ($\leqslant 20\%$ din normal) și a doua cu deficit minor. Cei din prima categorie sunt considerați homozigoți sau heterozigoți compuși, iar cei din a doua categorie heterozigoți. Frecvența genei printre evreii ashkenazieni a fost estimată la 4,3%.

Deficitul de F XIII se moştenește ca un caracter autosomal recesiv. Gena pentru „subunitatea a" a F XIII a fost localizată pe cromosomul 6, în apropierea locusului HLA, în timp ce gena pentru „subunitatea b" se găseşte pe un alt cromosom. Heterozigoții nu au sângerări, dar femeile heterozigote au o frecvență mare a avorturilor spontane (29).

BOLI HEMATOLOGICE CU EREDITATE AUTOSOMALĂ DOMINANTĂ SAU RECESIVĂ

Sferocitoza ereditară (SE). Recent, a devenit evidentă heterogenitatea genetică, moleculară şi clinică a acestei anemii hemolitice ereditare (tabelul 18.I) (25). La majoritatea pacienților cu SE modul de transmitere

TABELUL 18.I

Heterogenitatea genetică, moleculară şi clinică a sferocitozei ereditare (25)

Ereditatea	Clinica	Defectul molecular	Localitarea genei pe cromosomi	Frecvența
Autosomal dominantă	Hemoliză uşoară/moderată, rar severă	Ankrynă	8	Probabil comună
		Spectrină	14	Aproximativ 10% din pacienți
Autosomal recesivă	Hemoliză severă	Spectrină	1	Probabil rară
	Hemoliză uşoară/moderată	Proteina 4,2	?	Rară la albi, mai frecventă în Japonia
		Proteina banda 3		

este autosomal dominant, iar la puțini autosomal recesiv. În unele familii cu boală autosomală dominantă penetrația este variabilă. Starea de homozigot pentru SE cu ereditate comună autosomal dominantă este letală. La unii pacienți cu boală autosomală recesivă, severă, părinții au anomalii eritrocitare la limită (fragilitate osmotică sau alți parametri hemolitici). Aceasta sugerează că părinții sunt purtători asimptomatici, iar descendenții afectați sunt homozigoți sau dublu heterozigoți.

Eliptocitoza ereditară (EE). Majoritatea cazurilor cu EE au o ereditate autosomală dominantă. Tabloul clinic este extrem de variabil, reflectând leziunile moleculare heterogene. Uneori, EE se moştenește ca o tulburare autosomală recesivă de la un părinte asimptomatic cu acelaşi defect molecular de spectrină. EE este legată de antigenele de grup sanguin Rh şi Duffy ale căror gene sunt localizate pe cromosomul 1 (25).

Anemiile diseritropoietice congenitale (ADC) au un mod de transmitere, care variază după tipul morfoserologic, și anume tipul I și II autosomal recesiv, iar tipul III autosomal dominant (14). A. Coliță și colaboratorii (7) au prezentat 12 cazuri de ADC aparținând unui număr de 10 familii.

Hemocromatoza idiopatică are un mod de transmitere autosomal dominant sau recesiv (19). Forma heterozigotică apare la aproximativ 1 din 50 de locuitori, dar nu se exprimă prin nici un fel de modificare a rezervelor de fier. Expresia clinică apare la homozigoți. Manifestările clinice sunt de 5—10 ori mai frecvente la bărbați decât la femei (care pierd fierul prin menstruație și sarcini).

Methemoglobinemia ereditară poate rezulta fie din mutații, care duc la o substituție de aminoacizi în lanțul de globină (Hb M), fie din mutații, care duc la un deficit de NADH diaforază (methemoglobin reductază). Methemoglobinemia datorită Hb M se transmite ca o tulburare autosomală dominantă, în timp ce methemoglobinemia prin deficit de NADH diaforază se transmite ca o tulburare autosomală recesivă (3).

Boala von Willebrand (BvW). În contrast cu hemofiliile (A și B) care se transmit ca tulburări legate de cromosomul X, BvW este o tulburare autosomală. Ambele sexe sunt afectate aproximativ egal. Fiecare copil al unui părinte heterozigot are șansa 50% de a moșteni gena anormală.

Cele mai multe cazuri de BvW apar ca tulburări autosomale dominante, inclusiv cele mai multe cazuri de tip I și II. Dar, variabilitatea expresiei clinice și a datelor de laborator sugerează că penetrația este frecvent incompletă.

Unele familii cu BvW au un mod de ereditate autosomală recesivă. Astfel, cele două familii cu BvW tip II C și unii pacienți cu boală tip III severă au avut părinți consanguini, asimptomatici. Alți pacienți cu boală tip III s-au dovedit homozigoți sau „heterozigoți compuși". Severitatea bolii a fost legată de defectul dublu și nu de cel recesiv (34).

Porfiriile. Din cele 7 tipuri de porfirii, 5 au o ereditate autosomală dominantă și 2 autosomală recesivă (10). Porfiria acută intermitentă (PAI) se moștenește ca un caracter autosomal dominant. Uzual, expresia sa este precipitată de factori hormonali, metabolici, alimentari sau de mediu. Astfel, PAI este un exemplu excelent de tulburare „ecogenică". Gena, care codifică enzima deficientă (hidroximetilbilan sintetaza sau uroporfiria I sintetaza), a fost localizată pe cromosomul 11q 23-ter. Izolarea și caracterizarea genei a arătat că o singură genă codifică două transcripte, care au doi promotori, unul responsabil de expresia transcriptului pentru forma enzimatică din toate țesuturile și altul pentru transcriptul specific eritroid. Heterozigoții pot fi confirmați prin analiza *polimorfismului lungimii fragmentelor de restricție* (PLFR). S-a făcut diagnosticul prenatal al unui fetus heterozigot afectat (30).

Lipidozele (boala Gaucher, boala Nieman-Pick, boala Tay-Sachs, boala Sandhoff, boala Wolman, boala Krabbe, gangliosidoza GM_1, leucodistrofia metacromatică) au un mod de transmitere autosomal recesiv. Face excepție boala Fabry, care are o ereditate legată de cromosomul X. Dintre lipidoze, boala Gaucher poate fi întâlnită la adulți. Apariția bolii Gaucher în mai multe generații succesive a dus la concluzia eronată că

ereditatea este dominantă. Aceste pedigree-uri se explică prin căsătorii între persoane cu boală Gaucher și purtători. Frecvența acestei boli este mare la populațiile evreiești. Gena glucocerebrozidazei este complexă și constă dintr-o genă 5′ funcțională flancată de o pseudogenă 3′. La baza bolii stau mutații punctiforme sau *crossing-over* inegal între gena glucocerebrozidazei și pseudogenă (33).

EREDITATEA DOMINANTĂ LEGATĂ DE CROMOSOMUL X

Definiție. Ereditatea dominantă legată de cromosomul X (DX) este un mod de ereditate determinat de genele de pe cromosomul X, iar caracterele dominante au o expresie clinică completă în prezența unei singure gene anormale, adică la toți bărbații homozigoți ($\overline{X}Y$) și la femeile heterozigote ($\overline{X}X$).

Criterii. În figura XVIII.6 apare pedigree-ul stereotip pentru acest mod de ereditate (31, 36).

1) Bărbații afectați (I — 1) au toate fetele heterozigote ($\overline{X}X$) afectate (II — 2 și 3) și toți băieții normali (XY) (II — 4 și 5).

2) Femeile heterozigote afectate (II — 2) transmit boala la 50% din copii, indiferent de sex (III — 1 și 3). Femeile homozigote afectate transmit boala tuturor copiilor. Caracteristic este absența transmiterii ♂→♂.

3) Femeile afectate sunt de aproximativ două ori mai frecvente decât bărbații afectați. Întrucât ele sunt aproape întotdeauna heterozigote, expresia clinică este variabilă, dar mai puțin severă decât la bărbații hemizigoți afectați (31).

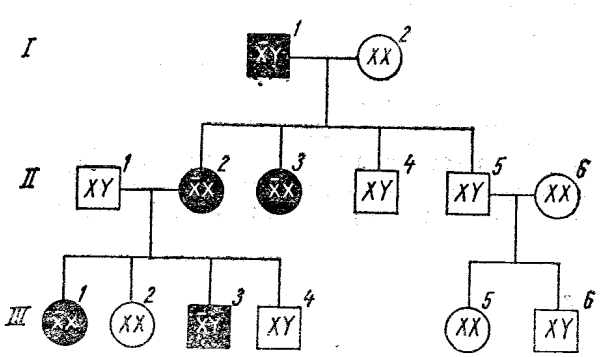


Fig. XVIII.6. — Pedigree stereotip pentru ereditatea dominantă legată de cromosomul X; de remarcat că bărbatul afectat (I-1) nu are nici un băiat afectat (II-4 și 5), dar toate fetele sunt heterozigote, afectate (II-2 și 3) (31, 36); pătrat gol: bărbat sănătos; pătrat plin: bărbat bolnav; cerc gol: femeie sănătoasă; cerc plin: femeie bolnavă; $\overline{X}$ = cromosom X cu genă mutantă.

4) La femeile afectate există o frecvență crescută de avorturi, reprezentate de fetuși de sex masculin afectați (36).

5) Unele tulburări dominante legate de cromosomul X apar numai la femei heterozigote, întrucât boala este letală la bărbații hemizigoți afectați (36).

Ereditatea dominantă legată de cromosomul X (DX) în hematologie. Acest mod de ereditate este rar. În hematologie un exemplu de ereditate

DX este *sistemul de grup sanguin Xg*. Sistemul Xg este guvernat de o pereche de alele: Xg^a și Xg, care produce două fenotipuri Xg (a+) și Xg (a—). La bărbați sunt posibile genotipurile: Xg^aY și XgY și fenotipurile Xg(a+) și Xg(a—). La femei sunt posibile genotipurile: Xg^aXg^a și Xg^aXg și fenotipurile: Xg(a+) și Xg(a—).

Transmiterea acestui grup sanguin se face conform modului general al eredității DX (31). Importanța clinică a sistemului Xg este minimă, dar el este interesant pentru geneticieni din cauză că gena care guvernează acest sistem este situată pe cromosomul X (27).

EREDITATEA RECESIVĂ LEGATĂ DE CROMOSOMUL X

Definiție. Ereditatea recesivă legată de cromosomul X (RX) este un mod de ereditate determinat de genele de pe cromosomul X, iar caracterele recesive au o expresie clinică completă la toți bărbații hemizigoți ($\overline{X}$Y) și la rarele femei homozigote ($\overline{X}\overline{X}$).

Criterii. În figura XVIII.7 apare pedigree-ul stereotip pentru acest mod de ereditate (31, 36).

1) Incidența bolii este mai mare la bărbați decât la femei.

2) Gena mutantă ($\overline{X}$) se transmite de la bunicul matern afectat (I — 1.) prin toate fetele sale heterozigote ($\overline{X}$X) purtătoare (II—2 și 3) în medie la 50% din nepoți (III—3).

3) Boala nu se transmite niciodată direct de la tată la fiu (♂→→♂) (I—1→II—4 și 5).

4) Bărbații afectați din diverse generații (I—1 și III—3) sunt legați unul de altul prin femei purtătoare (II—2).

5) În contrast cu tabloul clinic sever de la bărbații hemizigoți ($\overline{X}$Y), femeile heterozigote ($\overline{X}$X) purtătoare au o expresie clinică variabilă (explicația: vezi *teoria Lyon*).

6) Dacă caracterul este rar, părinții și rudele bolnavilor vor fi normali cu excepția rudelor de sex masculin de pe linia maternă (în medie 50% din unchii materni vor fi afectați). Afectarea unchilor și nepoților produce un pedigree „oblic" în contrast cu pedigree-ul „vertical" din

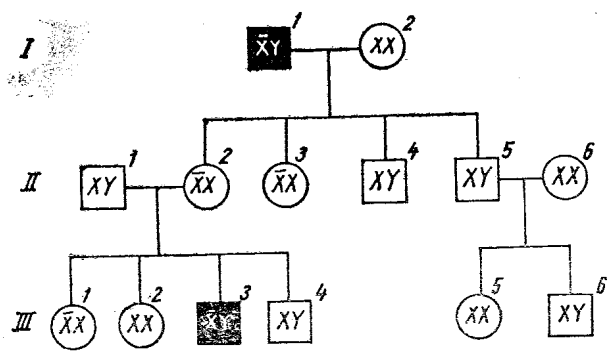


Fig. XVIII.7. — Pedigree stereotip pentru ereditatea recesivă legată de cromosomul X; de remarcat: transmiterea de la bunicul matern, afectat (I-1) prin toate fetele sale purtătoare (II-2 și 3) la 50% din nepoți (III-3) (31, 36).

ereditatea autosomală dominantă și cel „orizontal" din bolile autosomale recesive (36).

Teoria Lyon (inactivarea X). Mulți ani, acțiunea genelor situate pe cromosomii X a fost considerată o „enigmă" (31). Femeile au doi cromosomi X, iar bărbații un singur cromosom X. Teoretic, ar trebui ca proteinele determinate de genele situate pe cromosomii X (de exemplu F VIII, F IX, G6PD etc.) să aibă o concentrație de două ori mai mare la femei decât la bărbați. În realitate, aceste proteine se găsesc în cantități aproximativ egale la ambele sexe. Cum se poate explica acest fapt? (36).

În 1962, Mary Lyon a demonstrat că la femei un singur cromosom X este activ genetic. Precoce în dezvoltarea embrionară, unul din cromosomii X de la femei devine genetic inactiv și formează corpusculul Barr. Inactivarea X interesează fie X patern (X^p), fie X matern (X^m) și se face la întâmplare („random"). Dar, odată inactivat același cromosom X (p/m) rămâne inactiv la toți descendenții clonali ai celulei respective. Pe scurt, inactivarea este „random", dar rămâne fixată.

Astfel, aproximativ jumătate din celulele somatice ale femeilor vor exprima X^p și aproximativ jumătate X^m. Din acest punct de vedere, femeile sunt un *mozaic.*

Dacă unul din cromosomii X poartă o genă mutantă, există posibilitatea ca aproximativ jumătate din celule să exprime fenotipul mutant. Cunoașterea inactivării X este importantă pentru înțelegerea variabilității expresiei bolilor RX la femeile heterozigote și pentru demonstrarea originii clonale a unor boli. Examenul electroforetic al variantelor (A/B) ale G6PD a făcut posibilă demonstrarea originii clonale a celulelor sanguine din diverse boli sanguine (bolile mieloproliferative cronice, hemoglobinuria paroxistică nocturnă și, posibil, leucemia acută mieloidă) (3).

În ce constă inactivarea X? Se consideră că inactivarea X are la bază metilarea ADN (radicalul citozină se transformă în 5-metil citozină în anumite zone ale ADN) (31).

Tipul diferit de metilare al citidinelor poate diferenția cromosomul X activ de cel inactiv. Pe de altă parte, endonucleazele de restricție pot distinge citidina metilată de cea nemetilată. În acest fel, a devenit posibil ca prin analiza PLFR ale ADN să se determine originea clonală a neoplasmelor, chiar atunci când nu există un polimorfism al unei enzime legate de cromosomul X (3, 12).

BOLI HEMATOLOGICE CU EREDITATE RECESIVĂ LEGATĂ DE CROMOSOMUL X (RX)

Hemofiliile A (deficitul de F VIII) și **B** (deficitul de F IX) reprezintă exemplul clasic de boală RX. Genele pentru ambele proteine F VIII și F IX) sunt localizate pe cromosomul X. Se știe că gena pentru F VIII este una din cele mai mari gene, reprezentând 0,1% din întreg cromosomul X.

Hemofiliile (A și B) sunt limitate aproape exclusiv la bărbați ($\overline{XY}$), ai căror băieți sunt normali (XY), dar ale căror fete sunt obligatoriu purtătoare ($\overline{XX}$). Purtătoarele transmit boala la 50% din băieți și starea de purtătoare la 50% din fete.

Un pedigree „celebru" al hemofiliei A începe cu regina Victoria a Angliei, care a avut un băiat hemofilic și două fete purtătoare, heterozigote. Aceste fete au avut trei băieți hemofilici și patru fete purtătoare, heterozigote (17, 20).

Afectarea femeilor este rezultatul unei lyonizări extreme, anomalie a cromosomului X, ca sindromul Turner (45, X0 mozaicism X0 etc.) (23).

În prezent a devenit posibilă detectarea purtătoarelor cu probe de ADN pentru deleții de gene. Diagnosticul prenatal (în săptămânile 8—10 după concepție) poate fi făcut prin aplicarea analizei PLFR (28).

Deficitul de G6PD este enzimopatia umană cea mai frecventă și afectează aproape 1/10 din populația globului. Manifestările clinice apar în special la bărbații hemizigoți sau la femeile homozigote. Femeile heterozigote prezintă populații de eritrocite, care conțin fie izoenzime normale, fie mutante (mozaicism). Ele pot face crize hemolitice (după ingestia unor substanțe oxidante) în funcție de numărul de celule anormale (24).

Genele G6PD și ale hemofiliei A se găsesc situate pe cromosomii X la o distanță de aproximativ 4 *centimorgani* (5). Ele sunt strâns legate *(linkage)*. Probabilitatea ca un copil să moștenească sau nu ambele gene este mai mare decât aceea de a moșteni separat una din ele (3). G6PD are și o pseudogenă situată pe cromosomul 17. Pseudogenele apar prin *duplicație genică*.

Deficitul de 3-fosfogliceratkinază se manifestă clinic ca o anemie hemolitică cu sau fără tulburări neurologice (9).

Agamaglobulinemia legată de cromosomul X (tip Bruton). Prin analiza PLFR, gena care determină această tulburare a fost localizată pe porțiunea proximală a brațului lung al cromosomului X (Xq 21.3—q22). Se presupune că celulele pre-B utilizează cromosomul X cu gena mutantă, ca cromosom activ și de aceea ele nu se pot matura în celule B (18).

Boala granulomatoasă cronică. În unele familii această boală este transmisă ca o tulburare legată de cromosomul X (35). În alte familii ea este fie sporadică, fie moștenită autosomal, fie reprezintă inactivarea X a celulelor normale la purtătoare. Așa încât aspectele genetice, ca și tulburările biochimice sunt heterogene.

Unul din domeniile cele mai bine studiate ale eredității umane este reprezentat de sinteza și modul de transmitere al diverselor tipuri de Hb normale și patologice (26). Pe plan mondial, talasemiile sunt cele mai răspândite boli umane monogenice. Ele constituie o preocupare majoră pentru detecția prenatală a homozigoților (31).

Genetica are implicații în toate specialitățile medicale (11). În hematologie, genetica ocupă o poziție unică, atât prin bazele ei conceptuale, cât și prin aplicațiile practice (4).

În tabelul 18.II sunt prezentate o parte din bolile de sânge cu ereditate monogenică.

În epoca tehnologiei ADN recombinant, metodele „tradiționale" ale geneticii mendeliene își păstrează încă o valoare practică. Astfel, investigația în detaliu a familiei unui pacient cu o afecțiune hematologică și întocmirea pedigree-ului scurtează drumul diagnosticului și permite, în final, un sfat genetic adecvat (3).

TABELUL 18.II

Boli hematologice cu ereditate monogenică

I. Anemii	
1. Sferocitoza ereditară	AD/AR
2. Eliptocitoza ereditară	AD/AR
3. Piropoikilocitoza ereditară	AR
4. Hemoglobinopatii cantitative (talasemii) calitative (siclemie)	ACD
5. Deficitul de piruvat kinază	AR
6. Deficitul de G6PD	RX
7. Deficitul de 3 fosfoglicerat kinază	RX
8. Anemii diseritropoietice congenitale (tip I și II)	AR
9. Anemii diseritropoietice congenitale (tip III)	AD
10. Atransferinemia congenitală	AR
II. Sindroame hemoragice	
1. Telangiectazia hemoragică ereditară	AD
2. Trombastenia Glanzmann	AR
3. Sindromul Bernard-Soulier	AR
4. Deficitul de F VIII (hemofilia A)	XR
5. Deficitul de F IX (hemofilia B)	XR
6.—11. Deficitele de F I, F V, F VII, F X, F XI și F XIII	AR
12. Disfibrinogenemia congenitală	AD
13. Boala von Willebrand	AD/AR
III. Lipidoze*	
1. Boala Gaucher	AR
2. Boala Niemann-Pick	AR
3. Boala Tay-Sachs	AR
4. Boala Sandhoff	AR
5. Boala Wolman	AR
6. Boala Krabbe	AR
7. Gangliosidoza GM_1	AR
8. Leucodistrofia metacromatică	AR
9. Boala Fabry	RX
IV. Porfirii	
1. Porfiria acută intermitentă	AD
2. Coproporfiria ereditară	AD
3. Porfiria variegata	AD
4. Porfiria cutanea tarda	AD
5. Protoporfiria eritropoietică	AD
6. Porfiria eritropoietică congenitală	AR
7. Deficitul de ALA-dehidratază	AR
V. Diverse	
1. Methemoglobinemia asociată cu Hb M	AD
2. Methemoglobinemia prin deficit de NADH diaforază	AR
3. Hemosideroza idiopatică	AD/AR
4. Agamaglobulinemia Bruton	RX
5. Boala granulomatoasă cronică (unele forme)	RX
6. Anomalia Pelger-Huët	AD
7. Anemia aplastică congenitală (anemia Fanconi)	AR

Legenda:
AD: autosomală dominantă
AR: autosomală recesivă
ACD: autosomală codominantă
RX: recesivă legată de cromosomul X

* Dintre lipidoze, numai boala Gaucher poate fi întâlnită la adulți, restul la copiii mici.

Trei sunt întrebările principale la care urmează să se răspundă.

1) *Boala pacientului are o ereditate monogenică sau poligenică?* Analiza pedigree-ului permite să stabilim dacă distribuția cazurilor în diferite generații este conformă sau nu cu principiile de segregare și asortare mendeliene, adică dacă tulburarea este monogenică sau poligenică.

2) *Care este modul de transmitere al tulburării monogenice?*

a) Prezența bolii la unul din părinți sugerează un mod de transmitere de tip „vertical" adică autosomal dominant.

b) Dacă există o consanguinitate la părinți și boala se regăsește la frați și surori, este probabilă o transmitere de tip „orizontal", adică autosomală recesivă.

c) Absența semnelor clinice la mamă și depistarea bolii pe linie masculină indică o ereditate de tip „oblic", legată de cromosomul X.

d) Transmiterea de la tată la fiu exclude o tulburare legată de cromosomul X și pune problema unei tulburări autosomale dominante.

3) *Care este boala de sânge cu un anumit mod de transmitere monogenică?*

a) O anemie hemolitică congenitală cu o transmitere autosomală este probabil datorită unui defect de membrană eritrocitară (sferocitoza ereditară sau eliptocitoza ereditară). Dar, o transmitere legată de cromosomul X sugerează o tulburare hemolitică prin deficit enzimatic (G6PD sau, mai rar, fosfoglicerat kinază).

b) Methemoglobinemia transmisă ca o tulburare autosomal dominantă este datorită unei hemoglobinopatii (Hb M), în timp ce methemoglobinemia transmisă ca o tulburare autosomală recesivă este datorită unui deficit enzimatic (deficitul de NADH diaforază).

c) Un sindrom hemoragic, care are o transmitere legată de cromosomul X, poate fi datorită deficitului de F VIII sau F IX. Din contra, o ereditate autosomală recesivă ridică posibilitatea deficitului altor factori de coagulare (F I, F V, F VII, F X, F XI, F XIII) (3).

BIBLIOGRAFIE

1. BENETT J. S.: În HOFFMAN R. și colab. (eds.): Hemotology, 1515—1518. Edit. Churchill-Livingstone Inc., New York, 1991.
2. BENZ E. J. Jr.: În HOFFMAN R. și colab. (eds.): Hematology. Edit. Churchill-Livingstone Inc., New York, 1991.
3. BEUTLER E.: În WILLIAMS W. J. și colab. (eds.): Hematology, ed. a IV-a, 71, 75, 76, 887. Edit. McGraw-Hill, New York, 1990.
4. BERCEANU ȘT., COLIȚĂ D., NICOARĂ S.: Consfătuirea USSM cu tema „Probleme actuale și de perspectivă în patologia genetică hematologică", București, 1989.
5. BOYER S. H., GRAHAM J. B.: Am. J. Hum. Genet. 1965; 17: 320.
6. CARLSON E. A.: Human genetics. Edit. D. C. Heath and Co, Lexington, Massachussetts, Toronto, 1984.
7. COLIȚĂ A. și colab.: Comunicare a VII-a Conferință Națională de Hematologie, București, 8—10. X. 1992.
8. COLIȚĂ A. și colab.: Comunicare Sesiunea științifică a Spitalului Clinic Fundeni, 14—15. XII. 1984.
9. CUSSENOT O.: Impact-internat 1991; 301—302.
10. DESNICK R. J., ANDERSON K. E.: În Hoffman R. și colab. (eds.): Hematology. Edit. Churchill-Livingstone Inc., New York, 1991, 353—355.
11. EMERY A. E. H., RIMOIN D. L.: Principles and practice of medical genetics. Edit. Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1983, 65.
12. FEARON E. R. și colab.: Science 1987; 238: 193.
13. FRANCK M. M. și colab.: Ann. Intern. Med. 1976; 84: 580.
14. GLADER B. E.: În Hoffman R. și colab. (eds.): Hematology. Edit. Churchill-Livingstone Inc., New York, 1991.
15. GOCIU MARIANA: Comunicare personală.
16. GUBLER M. și colab.: Amer. J. Med. 1981; 70: 493.
17. HARTL D. L. și colab.: Basic Genetics. Edit. Jones-Bartelett, Boston, 1987.

18. INSEL R.: În HOFFMAN R. și colab. (eds.): Hematology. Edit. Churchill-Livingstone Inc., New York, 1991.
19. KOSEK M. S.: În SCHROEDER S. A. și colab. (eds.): Current medical diagnosis and treatment. Edit. Appleton and Lange, Normalk, Connecticut, San Mateo, California, 1990, 1118.
20. MAXIMILIAN C., IOAN DOINA MARIA: Genetică medicală. Edit. Medicală, București, 1986.
21. McKUSICK V. A.: Mendelian Inheritance in Man, ed. a VII-a. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1986.
22. NICOLAU C. T., NICOARĂ S., NICOARĂ M., POPESCU E. R.: Med. internă (buc.) 1959; 7: 1081.
232. OLINICI C. D.: Citogenetică clinică. Edit. Dacia, Cluj-Napoca, 1983.
24. PAGLIA D. E.: În HOFFMAN R. și colab. (eds.): Hematology. Edit. Churchill-Livingstone Inc., New York, 1991, 506—507.
25. PALEK J.: În HOFFMAN R. și colab. (eds.): Hematology. Edit. Churchill-Livingstone Inc., New York, 1991.
26. PREDESCU C., BRATU V.: În BERCEANU Șt. (ed.): Hematologie clinică. Edit. Medicală, București, 1977.
27. RACE R. R., SANGER R.: Blood Groups in Man, ed. a VI-a. Blackwell, Oxford, 1975.
28. ROBERTS H. R., JONES M. R.: În WILLIAMS W. J. și colab. (eds.): Hematology, ed. a IX-a. Edit. McGraw-Hill Publishing, New York, 1990, 1462.
29. ROBERTS H. R., LOZIER J. N.: În HOFFMAN R. și colab. (eds.): Hematology. Edit. Churchill-Livingstone Inc., New York, 1991.
30. SASSA J. și colab.: J. Exp. Med. 1975; 142: 722.
31. THOMPSON J. S., THOMPSON M. W.: Genetics in medicine. Ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1986.
32. VÂLCU A., FLUIERAȘ M.: Comunicare personală.
33. ZIMRAN A. și colab.: Blood 1988; 76 (suppl. 1), 155 A.
34. WAGNER D. D.: În HOFFMAN R. și colab. (eds.): Hematology. Edit. Churchill-Livingstone Inc., New York, 1991, 1367.
35. WHITIN J. C. și colab.: J. Biol. Chem. 1980; 255: 1874.
36. WYNGAARDEN J. B.: În WYNGAARDEN J. B., SMITH L. H. (eds.): Cecil Textbook of medicine, ed. a XVIII-a. Edit. W. B. Saunders, Philadelphia, 1988, 146.

GLOSAR

Alelă: formă alternativă a unei gene; dacă într-un locus dat există mai mult decât 2 alele, ele se numesc *alele multiple* sau membrii ai unor serii alelice.

Autosomal: un cromosom din perechile 1—22, care nu este un cromosom sexual.

Codominant: dacă ambele alele ale unei perechi de gene sunt exprimate de heterozigoți, atunci alelele respective sau caracterele determinate de ele sunt codominante.

Centimorgan (cM): „unitatea de distanță" între 2 loci sau 2 gene adiacente; ea corespunde cu o frecvență de recombinare prin *crossing over* a celor 2 gene de 1% în cursul meiozei; exemplu: dacă 2 gene adiacente au o frecvență de recombinare de 4%, ele se găsesc localizate la o distanță de 4 centimorgani (0,04 morgani); un cM este echivalent cu o *„unitate map"*.

Centromer: regiune heterocromatică a cromosomului prin care *cromatidele* sunt legate între ele.

Consanguinitate: căsătorie între doi indivizi înrudiți (cu un ancestru comun), în care există probabilitatea să se „întâlnească" 2 gene recesive și să rezulte un descendent homozigot, bolnav.

Cromatidă: în cursul diviziunii celulare cromosomii sunt constituiți din 2 benzi paralele unite printr-un centromer; fiecare bandă este o cromatidă.

Cromosom: „organelă" nucleară, care apare vizibilă în cursul metafazei; la *eucariote* cromosomul este constituit dintr-o moleculă de ADN de care se leagă numeroase proteine; ADN are formă de „ghem" și conține o secvență lineară de gene; în contrast, la *procariote* ADN este frecvent circular și se leagă cu puține proteine; la virusuri cromosomul este constituit din ADN sau ARN, are formă lineară sau circulară și uzual nu se combină cu proteine.

Crossing over: procesul de schimb reciproc, care apare între 2 cromatide ale unei perechi de cromosomi omologi în timpul diviziunii reducționale a meiozei; acest proces duce la o recombinare de gene „linked".

Dominant: alelă sau caracterul fenotipic corespunzător care se exprimă la heterozigoți; unii autori (3, 36) consideră că numai caracterele fenotipice (și nu genele) pot fi *dominante* sau *recesive;* în contrast, vezi *recesiv.*

Duplicație: prezența unui segment de cromosom în duplicat; duplicația poate interesa o parte a unei gene, gene întregi sau serii de gene; duplicația poate duce la formarea unor *pseudogene.*

Expresivitate: gradul de expresie fenotipică a unei gene *penetrante;* dacă expresivitatea este variabilă, tabloul clinic poate varia de la moderat la sever.

Eucariot: celulă sau organism compus din celule, care au nuclei constituiți din ADN, înconjurați de membrane nucleare, cu organele citoplasmatice delimitate de membrane și la care diviziunea celulară se face prin mitoză sau meioză; în contrast, vezi *procariot.*

Gamet: celulă de reproducere matură (ovul sau spermatozoid) cu un număr haploid (23) de cromosomi, câte un membru din fiecare pereche de cromosomi.

Genă: unitate de ereditate capabilă să transmită un mesaj genetic; mai precis, un segment din molecula de ADN, implicată în sinteza unui lanț polipeptidic sau a unor molecule de ARN și care conține codul pentru acel polipeptid sau ARN.

Hemizigot: gene prezente într-o singură „doză", așa cum sunt genele de pe cromosomul X de la bărbați.

Heterozigot: individ care are 2 alele diferite dintre care una normală,

pe un anumit locus de pe o pereche de cromosomi omologi; în contrast, vezi *homozigot.*

Homozigot: individ care are o pereche de alele identice pe un anumit locus de pe o pereche de cromosomi omologi; în contrast, vezi *heterozigot.*

Linkage: genele „linked" au loci pe același cromosom la distanțe mici, măsurabile în *centimorgani;* ele pot să fie transmise împreună la descendenți cu o frecvență mai mare decât aceea la care ne așteptăm prin asortarea independentă din timpul meiozei.

Locus: mediul unei gene pe un cromosom; diferitele forme ale unei gene (alelele) pot ocupa un locus.

Meioză: tip special de diviziune, care apare în celulele germinale și prin care din celule diploide (cu 46 de cromosomi) (2n) se formează gameți haploizi (cu 23 de cromosomi) (n); în contrast vezi *mitoza.*

Mitoză: tip de diviziune a celulelor somatice, care duce la formarea a 2 celule, fiecare cu același complement cromosomial ca și celula parentală (46 de cromosomi).

Mozaic: individ sau țesut compus din două sau mai multe tipuri de celule diferite genetic și care derivă dintr-un zigot unic; a nu se confunda cu un individ compus din celule derivate din zigoți diferiți și care poartă numele de *himeră.*

Mutație: alterare ereditară a unei gene, care duce la o modificare a funcției genei respective; o *genă mutantă* este o genă care a suferit o mutație.

Pedigree: diagramă a istoricului familial, care conține membrii de familie, relația cu *probandul* și statusul cu privire la o anumită tulburare ereditară.

Penetrație: proporția de indivizi cu un genotip specific și care exprimă acel genotip în fenotip.

Polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție (PLFR): polimorfism în secvența ADN, care poate fi detectat pe baza diferențelor de lungime ale fragmentelor ADN produse prin digestie cu o enzimă de restricție specifică (vezi capitolul de genetică moleculară).

Proband (caz index, propositus/proposita): primul individ afectat și înregistrat dintr-un pedigree; pe pedigree este marcat cu o săgeată (vezi fig. XVIII.8).

Procariot: organism care nu are nucleul delimitat de o membrană și la care nucleul nu se divide prin mitoză sau meioză (exemplu: bacterii și alge); în contrast, vezi *eucariot.*

Pseudogenă: secvență de ADN, care se aseamănă cu gena funcțională corespondentă, dar care nu ajunge la producția unor produse de genă; pseudogena apare prin duplicație genică; exemple de pseudogene sunt lanțul β al globinei, G6PD și glucocerebrozidaza.

Recesiv: alelă sau caracterul fenotipic corespunzător, care se exprimă numai la homozigoți și nu se exprimă la heterozigoți; în contrast, vezi *dominant.*

Teoria Lyon (inactivarea X): inactivarea genelor de pe unul din cromosomii X (patern sau matern), precoce în viața embrionară în celulele somatice ale femeilor.

Zigot (ovul fertilizat): produsul unirii unui gamet feminin și al unui gamet masculin în reproducerea sexuală; la om, zigotul are 46 de cromozomi (2n).

XIX

ELEMENTE DE CITOGENETICĂ ÎN HEMOPATII MALIGNE

IOANA MOŢOIU

Cariotipul uman normal este modalitatea de identificare a perechilor de cromosomi, ce se bazează pe aşezarea lor sistematică conform unor norme acceptate internaţional (33, 34). El este constituit din 22 de perechi de cromosomi autosomali şi 2 cromosomi sexuali, totalizând numărul diploid de 46 cromosomi. Această configuraţie numerică şi structurală este stabilă la subiectul normal. Orice deviere de la acest standard indică o anomalie cromosomială.

Anomaliile cromosomiale pot fi numerice, structurale sau combinate, purtând denumirea de „aneuploidie".

Anomalii numerice sunt devieri de la numărul normal diploid ($23\times2=46$) sub formă de:

— pierderea sau câştigarea unui număr de cromosomi, realizând hipo- respectiv hiperdiploidie;

— numere multiple ale întregului set cromosomial, de exemplu $23\times3=69$ — triploide; $23\times4=92$ — tetraploidie, până la poliploidii diferite.

Aceste anomalii se produc în urma unor defecte în mecanismul mitozei. Pierderile se realizează prin nondisjuncţie sau întârzieri anafazice, iar câştigurile prin endoreduplicaţii, endomitoză.

Anomaliile structurale conduc la modificarea morfologiei cromosomului şi implicit a secvenţelor normale ale genelor. Cauzele lor sunt multiple: radiaţii, agenţi fizici, chimici, metaboliţi, virusuri sau alte cauze încă nedeterminate. Ca prim eveniment apare o ruptură cromatiniană sau cromosomială, în funcţie de etapa ciclului în care *acţionează*. Prin tehnica de bandare se observă localizări preferenţiale ale rupturilor în anumite locuri fragile (30). Capetele rupte au capacitate adezivă care conduce la reunirea la locul rupturii cu reparare, în majoritatea cazu-

rilor. Alteori are loc o alipire de alte capete rupte, rezultând diferitele tipuri de anomalii structurale. În lezări grave ale capetelor rupte acestea nu mai fuzionează, rămânând deletate. Tipurile de aberații structurale depind de natura, numărul rupturilor și de modul lor de fuzionare (tabelul 19.I).

TABELUL 19.I

Tipuri de aberații structurale

Simbol cariotipic	remanierea
p =	braț scurt
q =	braț lung
+ =	înainte de cromosom: câștigul unui cromosom întreg; după cromosom: câștigul unei părți din cromosom
— =	pierderea unui cromosom întreg sau a unei părți din cromosom
f.ac. =	fragment acentric: segment de cromosom fără centromer rezultat al unei rupturi fără reunire
del =	deleție: lipsa unui fragment pierdut în urma unei rupturi (terminală) sau a unui segment în urma a două rupturi (interstițială)
t =	translocație: câte o ruptură la doi cromosomi diferiți cu schimb de material genetic; în t reciproce nu se observă pierdere de material genetic
dic =	dicentric: câte o ruptură pe 2 cromosomi diferiți cu reunirea capetelor rupte formează un cromosom cu doi centromeri
inv =	inversie: două rupturi se produc în același cromosom cu rotarea și realipirea fragmentelor produse: „paracentrică" — rupturile de aceeași parte a centromerului; „pericentrică" — rupturile pe părți opuse ale centromerului
iso =	isocromozom: diviziunea greșită a centromerului cu pierderea unor brațe, duplicarea brațelor rămase, produce în metafază un cromosom cu brațe perfect egale
r =	inelar: două rupturi la câte un capăt al unui cromosom, urmat de reunirea acestor capete între ele

Prezența anomaliilor cromosomiale influențează soarta celulei purtătoare după cum urmează:

1) incompatibilitate cu viața celulei;

2) compatibilitate, dar apar modificări fenotipice datorită cărora celula este depășită în competiția cu celulele normale, sau este recunoscută ca străină de sistemul de supraveghere imună și eliminată;

3) celula modificată fenotipic dobândește un avantaj metabolic față de omologii normali. Într-un anumit context această celulă anormală câștigă posibilitatea de diviziune și produce celule-fiice identice, care alcătuiesc o *clonă* celulară individualizată prin anomalia genetică respectivă.

Capacitatea clonei anormale de multiplicare, intrând în competiție cu celulele normale și depășindu-le constituie una din etapele transformării maligne. În prezent se consideră că toate bolile maligne au mutații genice și că sunt boli clonale (31). Nu însă toate proliferările clonale sunt maligne, cunoscându-se exemple de acest fel în autoimunitate, stimularea imună a limfocitelor B, hemoglobinuria paroxistică nocturnă și în anumite stări preleucemice. De obicei aceste clone sunt reduse ca număr de celule, nu posedă un avantaj proliferativ definitiv și dispar odată cu cauza care le-a produs. În cazul neoplaziilor, clonele inițial reduse, proliferează și devin dominante în țesutul tumoral. Componența clonală poate fi variată în cadrul aceleiași neoplazii, dar sunt cunoscute anomalii

cromosomiale clonale specifice ce se asociază preferenţial cu anumite tipuri de leucemie sau limfom. Acestea constituie *markeri genetici* cu valoare diagnostică şi prognostică (11). Ca şi celulele maligne pe care le reprezintă, clonele anormale variază în funcţie de etapa clinică şi de răspunsul la terapie, reducându-se sau dispărând în cursul unei remisiuni şi reapărând în recăderi.

Celulele cu genom anormal au mare instabilitate şi îşi modifică continuu cariotipul iniţial, deţinând o capacitate crescută de a utiliza mutaţiile spontane. Printr-un mecanism de selecţie supravieţuiesc numai acele subclone derivate care se pot adapta noului echilibru metabolic creat de ele însele şi de acţiunea agenţilor terapeutici (16). Astfel, în evoluţia unui proces malign, modificările continue ale genomului se manifestă prin adăugiri de noi anomalii cromosomiale în cadrul clonei iniţiale. Câştigarea noilor anomalii se face într-o anumită ordine reglată de legi metabolice. Acest aspect a fost descris ca *„fenomenul evoluţiei clonale"* de către Lejeune, Berger şi De Grouchy (11, 3, 12).

Orice schimbare cariotipică în care, pe lângă clona majoritară, se identifică subclone derivate conţinând şi aberaţia iniţială, anunţă cu câteva luni înainte producerea fazei accelerate a bolii.

Metodele de studiu citogenetic au un grad mare de dificultate, necesitând precizie şi experienţă în efectuarea lor.

Analiza citogenetică în hemopatii maligne este condiţionată în primul rând de evidenţierea metafazelor în celulele maligne. Pentru a realiza acest obiectiv trebuie analizat direct ţesutul tumoral viabil, care în leucemii este măduva osoasă, iar în limfoame ţesutul ganglionar. Când aceste ţesuturi nu sunt accesibile, dar există blastoză peste 50% în sânge, se efectuează analiza citogenetică a celulelor leucemice sanguine, dar cu şanse mai reduse de reuşită. Prima dificultate constă în inducerea mitozei în celula leucemică. Se cunosc diferite modalităţi de optimizare a condiţiilor de cultură, sincronizare, substanţe stimulante şi preparări specifice (21). Se urmăreşte obţinerea de cromosomi alungiţi din metafaze timpurii în care tehnicile de bandare dau rezultate mai bune. În acestea se preferă aplicarea mai multor coloranţi pentru evidenţierea a două tipuri de benzi (de exemplu C şi G) pe aceeaşi metafază. Apoi cariotipul se poate efectua cu aparatură computerizată. Numărarea a câte 30 de metafaze pe caz este obligatorie pentru stabilirea numărului modal.

Anomaliile structurale sunt denumite conform *sistemului internaţional al nomenclaturii citogenetice umane:* numărul total de cromosomi, cromosomii sexuali, câştig sau pierderi, rearanjamentul structural (33, 34). Pentru definirea unei clone anormale sunt suficiente 2 metafaze pseudo- sau hiperdiploide şi minimum 3 metafaze hipodiploide, fiecare deţinând aceeaşi anomalie cromosomială. O metafază fără anomalii indică linia celulară normală.

Ameliorarea tehnicilor de studiu a condus la creşterea frecvenţei cazurilor cu anomalii cromosomiale clonale în leucemii acute de la 50% la 80%, iar în limfoame nonHodgkin la 90%.

Specificitatea biologică a anomaliilor cromosomiale. Anomaliile cromosomiale structurale din leucemii şi limfoame au importanţă atât biologică cât şi aplicativă. Ca marker genetic, ele pot caracteriza fiecare he-

mopatie malignă în mod individualizat, dar se cunosc şi anomalii clonale specifice unor subtipuri de leucemii sau limfom, dintre care unele se deosebesc prin aspecte morfologice neobişnuite. Specificitatea lor este cu atât mai accentuată, prin faptul că tipuri similare de anomalii cromosomiale nu se regăsesc în alte tumori, nici în sindroamele cromosomiale congenitale.

Cu ajutorul tehnicilor de genetică moleculară s-au identificat diferite gene cu funcţii metabolice, la locurile de rupturi cromosomiale. Alte gene s-au dovedit a avea rol de protooncogene celulare.

Frecventa lor asociaţie cu anumite tipuri de hemopatii maligne sugerează că ele intervin activ în transformarea malignă. Cercetările actuale au început să definească în primul rând funcţiile normale ale produselor de codificare ale protooncogenelor. În rearanjările cromosomiale ce cuprind protooncogene, acestea sunt dereglate. S-a dovedit că ele trec sub controlul normal al genelor lângă care sunt translocate. În anumite situaţii oncogenele vor fi activate producând oncoproteine în exces, ale căror funcţii şi rol în carcinogeneză fac obiectul cercetărilor actuale (9). Este important deci de definit în analiza citogenetică a fiecărui caz, care este cromosomul recombinant critic, adică cel ce conţine secvenţa genică cu potenţial malign (tabelul 19.II) (15).

TABELUL 19.II

Cromosomi recombinanţi critici

Leucemie (limfom)	Rearanjament cromosomial	Fragment ce se translocă	Gena rezultată
LGC	t(9; 22) (q34; p11)	9q34→22	BCR/ABL
LAM 2	t(8; 21) (q22; q22)	8q22→21	MOS/ETS
LAM 3	t(15; 17) (q22; q11)	17q11→15	PML/RAR
LAM 4 EO	inv(16) (p13; q22)	16p13→q22	Metalotionin
L. Burkitt	t(8; 14) (q24; q32)	8q24→14	MYC
L. folicular	t(14; 18) (q32; q21)	18q21→14	BCL 2

Valoarea prognostică a anomaliilor cromosomiale. Factorii de prognostic stabiliţi prin analize uni- sau multifactoriale sunt greu de evaluat, mai ales că nu sunt constanţi, fiind influenţaţi de terapie. Dintre aceştia factorii citogenetici reprezintă criterii de prognostic cu valoare predictivă pentru gravitatea manifestărilor clinice, durata remisiunii complete şi a supravieţuirii, în mod independent de parametrii clinici, hematologici şi imunologici (5). Ei pot fi evaluaţi sub două aspecte: cantitativ şi calitativ. Astfel prezenţa unei clone anormale constituie în cele mai multe cazuri un factor de risc pentru apariţia unei hemopatii maligne (2). Dimensiunea clonei (numărul de metafaze anormale) indică extensia procesului malign în ţesutul respectiv, iar metafazele normale cuantifică ţesutul normal care ar avea capacitatea de repopulare în urma eradicării celulelor neoplazice prin terapie. Studii asupra unor leucemii şi limfoame indică supravieţuiri semnificativ mai lungi la cazurile care au un procent mai mare de metafaze normale în ţesutul tumoral (17).

Clonele anormale au valoare de marker genetic util pentru urmărirea evoluției clinice a unei leucemii. Reducerea sau dispariția clonei corespunde cu remisiunea parțială sau completă, iar reapariția ei anunță recăderea. Adăugarea de noi anomalii ca fenomen evolutiv clonal se produce cu 4—5 luni înaintea declanșării fazei agresive, rezistente la terapie, a bolii. Efectuând examene citogenetice seriate în leucemie, recăderile și respectiv acutizarea pot fi detectate din timp, astfel ca să se poată interveni prin schimbarea terapiei cu una adecvată momentului evolutiv.

Analizele citogenetice și de genetică moleculară ale leucemiilor sunt importante și pentru diagnosticul tipului de leucemie, care poate permite selectarea tratamentului specific. Astfel, în leucemia promielocitară, caracterizată prin translocație (15, 17), tratamentul cu acid all-trans-retinoic a dus la un mare număr de remisiuni complete. Pe baza acestor observații au fost elaborate protocoale de selectare a bolnavilor pentru anumite tratamente, în funcție de criterii citogenetice sau de genetică moleculară. Ca exemplu, la bolnavii cu un risc mare de recidive, cum sunt cei la care au fost detectate rearanjamente ale genei MLL, este indicată o chimioterapie intensivă și transplant de măduvă osoasă allogeneică (29a).

Complexitatea anomaliilor cariotipice din cadrul clonal se corelează cu durata de supraviețuire în cazul sindroamelor mielodisplazice și a leucemiilor mieloblastice acute, nu însă și în cazul limfoamelor maligne (31). Numărul modal poate avea semnificație prognostică, în sensul că hiperdiploidia se corelează cu durate lungi ale remisiunilor complete și supraviețuirii în leucemiile acute limfoblastice, dar cu un prognostic defavorabil în cazul leucemiilor acute mieloblastice (15, 17).

În leucemiile acute mieloblastice, circa 30% din anomaliile cariotipice observate constau în translocații specific asociate cu câte un subtip deosebit din clasificarea FAB. Cele mai tipice sunt următoarele:

- t (15; 17) (q22; q11) 95—100% cazuri LAM3 — prognostic intermediar;
- t (8; 21) (q22; q22) 10—30% cazuri LAM2 — prognostic favorabil;
- inv (16) (p13; q22) sau del. 16q22 90—100% cazuri LAM4 cu eosinofile — prognostic favorabil. La punctele de rupere în baza cărora s-au făcut remanierile s-au identificat protooncogene cu rol posibil în transformarea malignă. Se descriu și alte anomalii clonale întâlnite mai frecvent în anumite subtipuri de leucemii și limfom, având implicații prognostice diferite.

Analiza moleculară a anomaliilor structurale cromosomiale în hemopatiile maligne, ca și în alte neoplazii, a permis identificarea unui număr de gene implicate în rearanjările cromosomiale. Alterările acestor gene participă la dezvoltarea procesului malign. Astfel, de exemplu, în leucemia granulocitară cronică protooncogena ABL este translocată de pe cromosomul 9 pe gena BCR de pe cromosomul 22, realizând o genă himerică cu o proteină de fuziune; asemenea gene himerice cu funcții aberante, rezultate din alte translocații au mai fost identificate în aceeași boală. Alte translocații au fost observate și în leucemiile acute induse de tratament, în special în cazurile tratate cu inhibitori ai topoizome-

razei II. În leucemia limfoblastică acută (LLA) astfel tratată s-a pus în evidență, alături de markerii celulelor B limfoide preexistenți, apariția de markeri mieloizi sau monocitoizi, iar în leucemia mieloidă acută (LMA) astfel tratată, au fost observate cazuri cu apariția subsecventă de leucemie acută mielomonocitară, sau de leucemie acută monoblastică, cu expresia de markeri limfoizi pe lângă cei mieloizi corespunzători leucemiei mieloide acute. Aceste fapte sugerează că rearanjamentele genetice pot interesa în aceste cazuri o celulă progenitoare pluripotentă, capabilă de diferențiere în sens mieloid și limfoid.

Translocațiile la nivelul bandei cromosomiale 11q23 [banda cromosomială de pe brațul lung (q) al cromosomului 11] constituie cea mai frecventă anomalie citogenetică în hemopatiile maligne de la copii, fiind găsite în circa 70% din toate cazurile de LMA și LLA. Bolnavii cu aceste leucemii care prezintă translocația 11q23 au o formă clinică agresivă, adesea cu hiperleucocitoză și cu afectare precoce a sistemului nervos central.

Recent a fost identificată și clonată o genă denumită MLL *(myeloid-lymphoid leukemia)* și s-a demonstrat prin metoda Southern blot că în toate leucemiile cu translocația 11q23 și în majoritatea celor cu aberații rare are loc rearanjamentul acestei singure gene MLL, care apare a fi una din oncogenele cel mai frecvent implicate în hemopatiile maligne (29a). Un fapt deosebit este că gena MLL codează la mamifere o proteină înrudită îndeaproape cu o proteină numită tritorax a muștei *Drosophila melanogaster* și ale cărei mutații au ca urmare transformări morfologice bizare ale toracelui și abdomenului acestei muște. S-a sugerat posibilitatea existenței unei ierarhii genetice similare care reglează dezvoltarea embrionară la muște și diferențierea celulelor măduvei osoase la om (4a).

LEUCEMIA GRANULOCITARĂ CRONICĂ (LGC)

În 1960, Nowell și Hungerford (20) au descris cromosomul Philadelphia (Phl), prima anomalie cromosomială corelată specific cu un tip de leucemie. Considerată inițial ca deleția brațelor lungi ale cromosomului G prin tehnicile de bandare s-a dovedit că anomalia este o translocație t(9; 22) (q34; q11). Au fost identificate oncogene omologe celor din neoplaziile virotice de la animale, pe cromosomul 9q34 oncogena ABL (leucemia murină Abelson), iar pe cromosomul 22q11 oncogena SIS sau BCR (sarcom simian). Punctele de rupere de pe cromosomul 22 pot fi variabile în trei regiuni bcr 1, 2 sau 3, împărțind gena în mod diferit. În LGC ruptura are loc în bcr3, producând un fragment BCR ce migrează pe cromosomul 9, dar cea mai mare parte a ei rămâne pe loc. Lângă ea se așează întreaga genă ABL care se rupe într-un punct constant situat deasupra ei. Pe cromosomul 22 se formează o genă himerică BCR/ABL ce codifică o proteină cu greutate moleculară 21 Okd. Ea reprezintă forma activată a proteinei normale produse de ABL, cu greutate de 145 kd și acțiune tirozinkinazică (10) (fig. XIX.1 și XIX.2).

Experimente pe șoareci transplantați cu măduvă osoasă singenică infectată cu retrovirus ce codifică proteină 210 kd induc o boală asemănătoare cu LGC, dovedind rolul patogenic al acestui produs.

Într-un mic număr de cazuri (5%) se constată variante ale acestei translocații cuprinzând și alți cromosomi pe lângă rearanjamentul genei BCR.

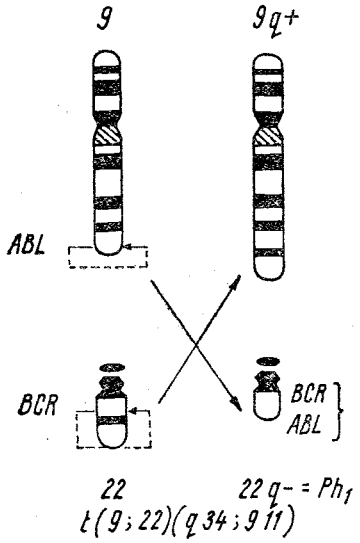


Fig. XIX.1. — Schema translocației din LGC t (9; 22) (q34; q11).

Translocația este prezentă în faza cronică în majoritatea celulelor mieloice. Originea ei clonală a fost inițial dovedită prin markeri enzimatici. Deoarece se identifică aceeași translocație și în seria eritrocitară, megacariocitară și în macrofagii medulari în LGC, sugerează că ea se produce inițial la nivelul celulei stem pluripotente.

Ca incidență, cromosomul Phl este prezent la 85% din bolnavii cu LGC. Se cunosc însă între 5 și 15% bolnavi cu tablou clinicohematologic asemănător, dar cu lipsa Phl. Aceștia constituie un grup heterogen, deoarece la unele cazuri genetica moleculară identifică rearanjarea BCR chiar în lipsa aspectului citogenetic. În 3% din cazuri sunt bolnavi în vârstă, cu forme atipice și prognostic rezervat. În baza acestor date clinice, numeroși cercetători consideră această entitate în cadrul sindromului mielodisplazic, ca leucemie mielomonocitară cronică (5, 15). A fost descrisă o LGC Phl nega-

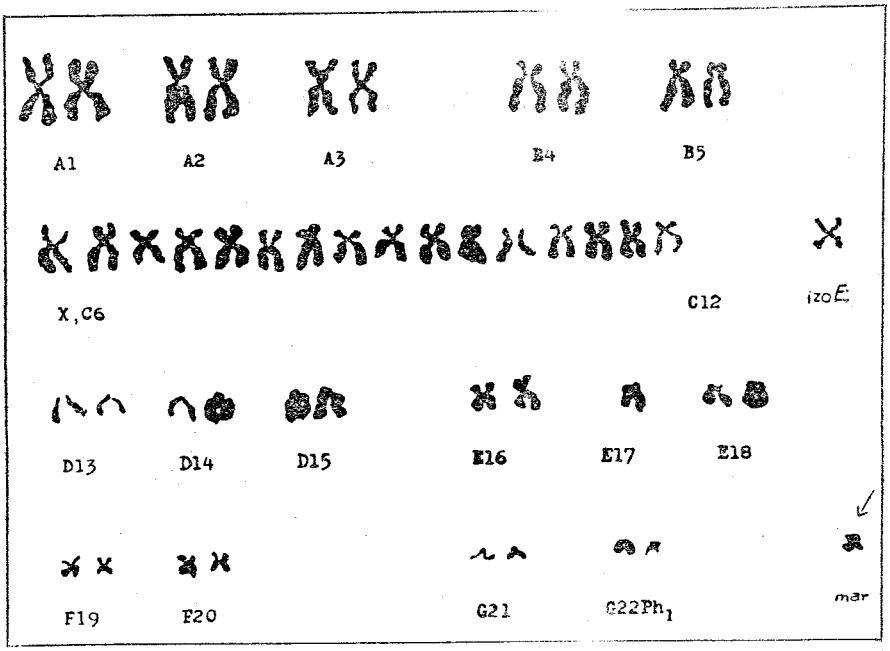


Fig. XIX.2. — Evoluție bariotipică. LGC faza acutizată.

tivă ca formă juvenilă, foarte rară, ce se însoțește de resturi de hemoglobină F, modificări imunologice și rezistență la tratament, care limitează supraviețuirea până la un an.

Specificitatea cromosomului Phl se discută în cadrul sindromului mieloproliferativ (18, 19). S-a detectat un cromosom Phl și în cazuri cu mielofibroză și metaplazie mieloidă, în policitemia vera, trombocitemia idiopatică și în rare cazuri de leucemii acute, mai ales limfoblastice. Parte din aceste cazuri pot reprezenta debutul unei LGC. Altă categorie pot avea deleția brațelor lungi ale cromosomului 22 fără translocația specifică. În LAL cu Phl pozitiv, gena BCR are alt punct de rupere decât în LGC. Astfel în cadrul translocației fuzează numai primul exon BCR cu ABL, producând o proteină cu greutate moleculară mai mică, 185—190 kd și cu o activitate biologică diferită. Această formă de LAL are un prognostic rezervat.

Constanța cromosomului Phl în LGC, ca și specificitatea produsului proteic al genei de fuziune, atestă valoarea diagnostică de marker genetic pentru această leucemie.

În progresia bolii, cromosomul Phl variază în concordanță cu etapa evolutivă. În remisiunile consecutive chimioterapiei, clona Phl+ dispare complet din sânge și incomplet din măduvă. Eradicarea ei completă din măduvă se obține în urma transplantului medular. Reapariția clonei în sânge anunță cu circa 3 luni înainte etapa de recădere. Faza de acutizare este precedată la 80% din cazuri cu câteva luni înainte prin apariția de alte anomalii ale clonei Phl+. Modelul evoluției clonale în LGC respectă următoarea ordine: primul se duplică cromosomul Phl, apoi se formează izocromosom de braț lung nr. 17 sau trisomie 17, după care urmează trisomie 8 sau 19. Se realizează numere modale între 47 și 50 de cromosomi (26, 3, 12, 13). Constatarea acestui fenomen este semn de prognostic sever: instalarea rezistenței față de terapia din faza cronică cu timp de supraviețuire redus. În general aceste modificări ale cariotipului nu se corelează cu diferitele fenotipuri mielo-, mono- sau limfoide din criza blastică (fig. XIX.3).

Originea clonelor aberante din faza de acutizare poate fi medulară sau extramedulară. Unii autori, efectuând puncții seriate splenice, au observat apariția evoluției clonale cu 5 luni înainte în splină față de măduva osoasă. Alte observații au identificat evoluția clonală în ganglionii limfatici invadați cu blaști mieloici, cu câteva luni înaintea modificărilor citogenetice de fază acută în măduvă (26).

Studii de genetică moleculară au căutat să explice mecanismul de trecere la faza acută. Gena P53 cu rol supresor al transformării induse prin mutații, se deletează împreună cu brațele scurte ale cromosomului 17 la cazurile cu izo 17q. Posibil că există și alte mecanisme la nivel genic încă neidentificate (10).

LEUCEMIA ACUTĂ MIELOBLASTICĂ DE NOVO

Unii autori sugerează că orice bolnav cu leucemie acută nonlimfoidă ar avea un defect cromosomial (31). Optimizarea tehnicilor citogenetice a crescut frecvența anomaliilor citogenetice la 68—80% în

LAM (21). Anomaliile clonale numerice sau/şi structurale prezintă un grad mare de variabilitate. Studii efectuate pe mii de cazuri indică însă o limitare în sensul că numai anumiţi cromosomi pot fi câştigaţi sau pierduţi. Mai mult, anumite translocaţii se asociază specific cu aspectul citomorfologic şi fenotipul imun, definind diferite subtipuri de leucemii (tabelul 19.III).

TABELUL 19.III

Leucemia acută mieloblastică: relaţii între puncte de rupere cromosomiale şi gene

Translocaţii specifice	Gene localizate	Subtip leucemic	Clinic	Morfologie Fenotip	Frecv. cazuri %	Prognostic
t(8; 21) (q22; q11)	MOS/ ETS	M2	75% copii	C. Auer+ FAN—	10—18	favorabil
t(15; 17) (q22; q11)	PML/ RAR	M3	CID	C. Auer+	90—100	interm.
inv(16) (p13; q22)	Metalo-tin	M4EO	lizozim seric+	eozinof. displazie bl. PAS+		
t(9; 11) (p22; q23)	EST 1, IFN	M5a	tineri		10—25	RC+ supravie-ţuire
del(11) (q23)		M4 M5			20	interm.
inv.(3) (q21; q26)		M7		megaca-riocite+ trombo-cite+	10	ND
t(9; 22) (q34; q11)	ABL	M1			5	nefavorabil
t(6; 9) (p23; q34)	ABL	M2 M4 multi-linii	tineri	bazofile+	2	nefavorabil
t(8; 16)		M5b				—
tris. 8		multi-lineal	58 ani		20	—
tris. 4		M4				—
del.(12) (p11—13)—		M2		bazofile+		—

Aberaţiile numerice pot interesa orice autosom sau cromosom sexual, în afară de cromosomul 16 niciodată în plus şi cromosomul 12 niciodată pierdut. Frecvenţa maximă se observă pentru câştigul de cromosom 8 şi pentru pierderea la cromosomii 7 sau 5, fiecare ca unică anomalie. Aberaţii ale celorlalţi autosomi se produc de regulă ca fenomene secundare, posibil în cadrul evoluţiei clonale. Prin analiza secvenţială a unei leucemii acute, se poate pune în evidenţă evoluţia cariotipică ce se produce după aceleaşi reguli ca şi în cazul LGC. În formele acute, evoluţia clonală se efectuează în etape mai scurte şi realizează numere modale hiperdiploide şi pseudotriploide.

Anomaliile structurale cu specificitate biologică constau în translocaţii corelate cu subtipuri FAB. La nivelul punctelor de rupere şi de joncţiune cromosomială s-au identificat locuri fragile, gene cu funcţii cunoscute, sau unele oncogene. Majoritatea rearanjamentelor structurale

se întâlnesc la tineri cu vârsta medie de 30 de ani. Cele mai importante sunt menționate în cele ce urmează (fig. XIX.3).

1) În LAM2 se descrie translocația reciprocă t (8; 21) (q22; q22) la nivelul brațelor lungi, cuprinzând locuri fragile și oncogene. Ea se însoțește cu pierderi de cromosomi sexuali X la femei, Y la bărbați, aspect rar întâlnit la tineri. Forma de leucemie este mai ales LAM2, mai rar

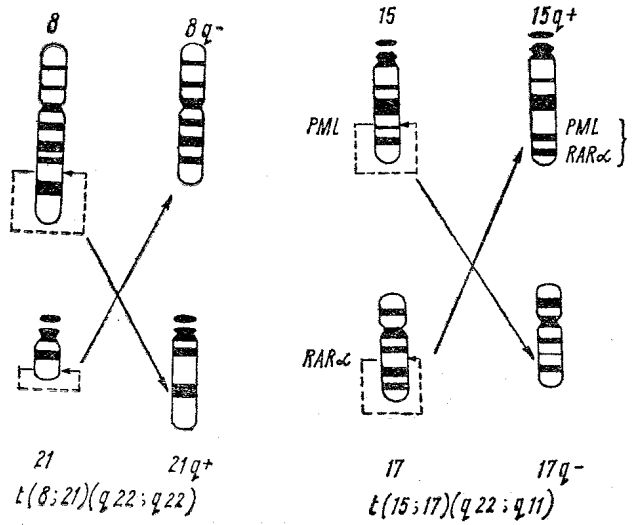


Fig. XIX.3. — Schema a două translocații specifice în LAM.

LAM4, cu nivel scăzut de fosfatază alcalină și procent mare de corpi Auer. Aceste forme au o supraviețuire mai lungă decât aceleași tipuri morfologice cu alte anomalii citogenetice.

2) O translocație întâlnită cu frecvență mare de 80% prin metoda citogenetică și 100% prin tehnici de genetică moleculară în LAM3, este cea care cuprinde brațele lungi ale cromosomilor 15 și 17: t (15; 17) (q22; q11). Prezența acestei translocații stabilește diagnosticul și în cazurile atipice, cu granulații greu detectabile, cum este varianta microgranulocitară. Se cunosc cazuri în care pe lângă translocație sunt prezente și alte anomalii cromosomiale. Tehnicile de genetică moleculară identifică două gene la punctele de rupere: pe cromosomul 15q22 este plasată PML (oncogena MYL) pe cromosomul 17q11 este localizat receptorul alfa pentru acid retinoic RAR alfa. Regiunea PML are trei posibile puncte de rupere, respectiv bcr 1, 2 sau 3, fapt care induce variabilitate mare la nivelul proteinelor transcrise. Acestea sunt provenite din genele fuzate pe cromosomul 15: PML/RAR și PML aberantă; proteina codificată de gene de fuziune de pe cromosomul 17 RAR/PML este instabilă. Funcția produsului RAR prin legarea acidului retinoic mediază diferențierea terminală a seriei mieloice. Însă produsului de fuziune PML/RAR nu i se cunoaște funcția și nu are rol de oncogenă. Faptul că acest tip de translocație este întâlnit în toate cazurile de LAM3 și numai în această boală, sugerează că produsul ei are potențial leucemo-

gen. Ca marker genetic ea folosește în evaluarea etapei clinice a bolii. Prin tehnici de genetică moleculară se detectează translocația 15; 17 înaintea recăderii, cu un interval de 3 luni precedând aspectul citogenetic.

3) Anomalii ale cromosomului 16, ca inversiune inv. 16 (p13; q22), deleția brațelor lungi sau translocație reciprocă t (16; 16) (p13; q22), se asociază ca o formă de LAM4 cu eozinofile anormale. Această formă are prognostic mai bun față de cazuri analoge cu cromosom 16 normal, evoluând cu o rată mare de remisiuni complete și cu timp de supraviețuire semnificativ prelungit.

Alte tipuri de anomalii cromosomiale sunt corelate mai rar cu diferite subtipuri de leucemii. Astfel, rearanjamente ale cromosomului 11 la brațele lungi q23 se întâlnesc în LAM5a la vârstă tânără; rearanjări ale cromosomului 3q21—26 se însoțesc de un număr mare de megacariocite medulare și trombocitoză; iar translocația reciprocă între nr. 6 și nr. 9 t (6; 9) (q23; q34) corespunde unei forme cu număr mare de bazofile și prognostic rezervat.

LEUCEMIA ACUTĂ MIELOBLASTICĂ INDUSĂ DE TERAPIE

Radioterapia ca și agenții alkilanți au potențial mare mutagen. Prelungirea duratei de viață a unor boli maligne în urma terapiei instituite, a crescut frecvența leucemiilor secundare induse prin terapie. Acestea prezintă anomalii cromosomiale într-un procent de 97% din cazuri, mai frecvente decât cele din leucemiile spontane. Anomaliile structurale cuprind de preferință cromosomii 5 și 7, cu lipsă sau deleție de brațe lungi, dar și cromosomii 1, 4, 12, 14, 18, aspecte mai rar întâlnite în leucemiile *de novo*. S-au identificat recent pe brațele lungi ale cromosomului 5 q23—31 gene ce codifică limfokine (3, 4, 5) și diferiți factori de creștere, a căror lipsă prin deleție conduce la modificări importante ale diferențierii celulare. Anomalii ale bandei cromosomiale 11q23 au fost întâlnite cu o frecvență de 80—90% în leucemiile acute secundare induse la copii cu leucemie limfoblastică acută tratați cu agenți ce inhibă topoizomeraza II, cum sunt epipodofilotoxinele etoposid și teniposid și la care translocațiile 11q23 erau absente, când copiii aveau leucemia limfoblastică acută. În asemenea cazuri, detectarea anomaliilor genei MLL poate permite monitorizarea în vederea detectării precoce, presimptomatice a leucemiilor secundare la bolnavii cu risc mare (4a). Leucemiile radioinduse se produc după o perioadă lungă de latență (peste 7 ani) de la iradierea terapeutică sau accidentală. În unele cazuri se identifică clone anormale caracterizate prin cromosomi dicentrici sau inelari produși în urma unor rearanjări complexe. Unii autori au urmărit pe parcursul evoluției bolii, efectuând repetate examene citogenetice, constituirea unei evoluții clonale cu cromosomi inelari (27). De regulă aceste cazuri sunt rezistente la terapie și au un prognostic rezervat (fig. XIX.4).

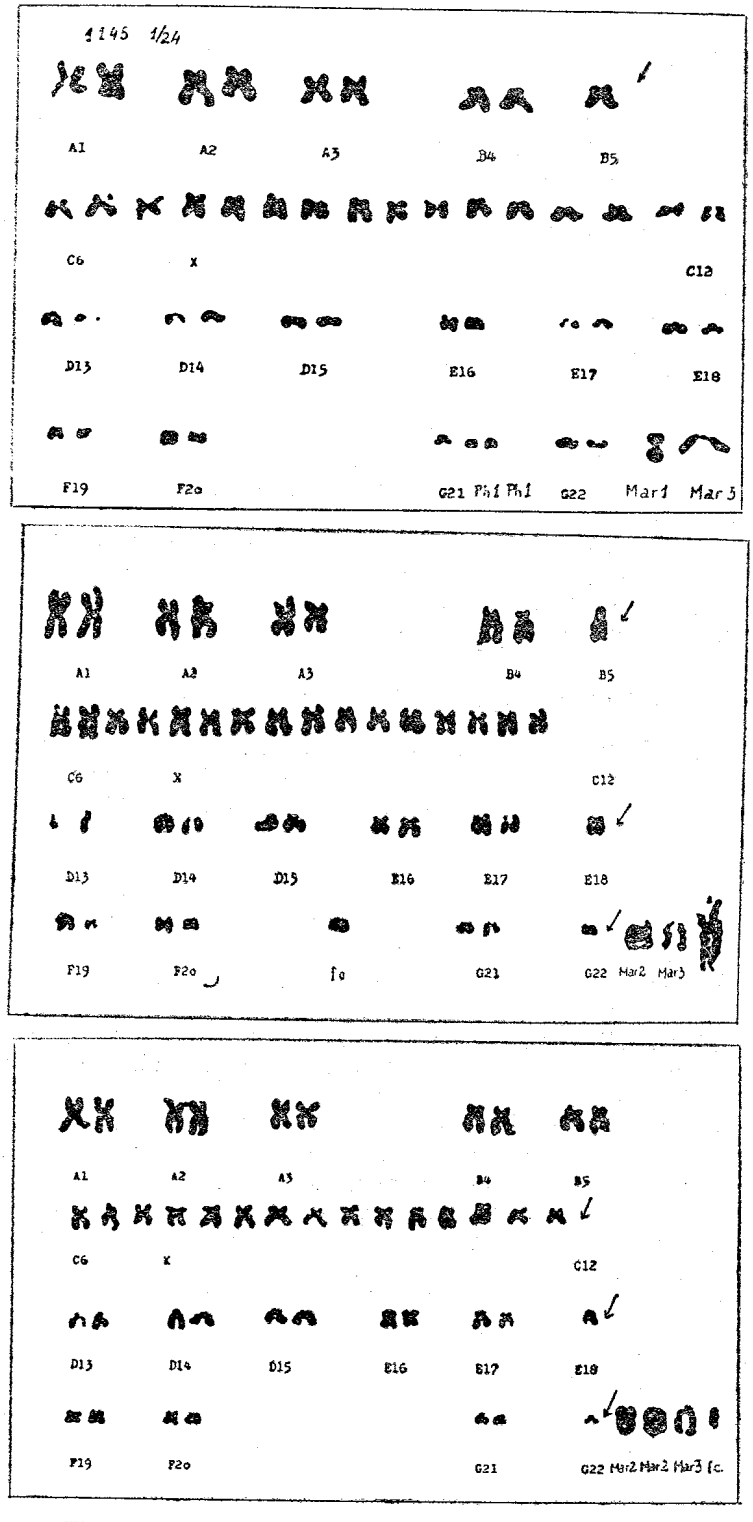


Fig. XIX.4. — Evoluție bariotipică. LAM radio-indusă.

SINDROAME CU POTENȚIAL PRELEUCEMIC

Este un fapt cunoscut că anemia Fanconi, ataxi-telangiectazia și sindromul Down au incidență crescută de transformare leucemică. Toate aceste afecțiuni dețin un grad de instabilitate genetică. Primele două au o deosebită sensibilitate de a face rupturi cromosomiale fie spontane, fie induse sub acțiunea unor substanțe chimice cu efect blocant al ADN-ului, iar sindromul Down este caracterizat prin trisomia 21.

Ocazional se pot detecta anomalii clonale care nu indică neapărat transformarea leucemică. Urmărite în timp, aceste clone pot dispărea, iar în unele cazuri ele proliferează.

Este de notat asemănarea localizării preferențiale a rupturilor cromosomiale din aceste boli cu cele observate în leucemii. În anemia Fanconi tipul de anomalii (monosomia cromosomului 7, rearanjări ale cromosomului 1) este asemănător cu cele observate în sindroamele mielodisplazice și în leucemiile secundare. În ataxi-telangiectazie se constată la nivelul limfocitelor rupturi cromosomiale interesând localizările genelor moleculelor de Ig și de receptor T (TCR), respectiv pe grupele: 14, 2, 22 și 7. Deoarece tipul de leucemie sau limfom ce apar în unele cazuri sunt de linie T, mai rar B, s-a atribuit eventuala lor producere anomaliilor cromosomiale sau clonelor preexistente cu mult timp înainte (2, 11, 23).

SINDROAMELE MIELODISPLAZICE

Mielodisplazia întrunește un grup heterogen de sindroame cu potențial leucemogen. În acest grup au fost găsite anomalii cromosomiale între 40 și 70% din cazuri. Cromosomii cel mai des cuprinși în rearanjamente sunt: cromosomul 8 ca plus, grupele 5q22, 7q21-31, 7p15,1 și 20 deletați sau pierduți. Nu s-au identificat anomalii cariotipice specifice. Apariția de clone anormale nu este socotită nici în aceste cazuri echivalentă cu transformarea leucemică (14). Sindromul caracterizat prin (5q—) deleția de braț lung al cromosomului 5, ca entitate distinctă constituie un astfel de exemplu. El a fost observat la femei în vârstă cu anemie refractară, cu număr redus de blaști și are o evoluție benignă mai mulți ani. În cazul anemiilor refractare cu exces de blaști o schimbare cariotipică, producerea unei clone anormale, indică un risc crescut pentru transformare leucemică.

Într-un număr mare de sindroame mielodisplazice, se constată frecvente rupturi cromosomiale sau cromatidiene în anumite locuri fragile ale cromosomilor: 5, 7 și 1. Deoarece aceleași grupe sunt incluse în anomaliile clonale ce se dezvoltă ulterior, este posibil ca acestea să fie precedate în timp prin rupturi neîntâmplătoare. Se menține ipoteza lui Hsu asupra ponderii instabilității cromosomiale în geneza neoplaziilor (14).

Eritroleucemia LAM6, considerată de numeroși autori ca un sindrom mielodisplazic cu potențial de transformare în LAM1 sau 2, are de cele mai multe ori clone poliploide. În cadrul acestor clone se produc rearanjamente cu formare de cromosomi markeri. Aceiași markeri pot fi observați și în metafazele hipodiploide, concomitent cu cele poliploide sau sub formă de clonă dominantă în leucemia mieloblastică de tip M1 sau 2, care are de regulă prognostic grav (21).

POLICITEMIA VERA

Anomalii cariotipice, în jur de 20% din cazuri, sunt întâlnite în special în cele tratate cu izotopi. Prezența unei anomalii cromosomiale nu indică instalarea leucemiei, decât odată cu noi modificări survenite în cariotip. Frecvent se pot observa în măduva osoasă anomalii neîntâmplătoare ca: trisomii 8 sau 9, deleția brațelor lungi ale cromosomului 20, trisomie de braț lung la cromosomul 1. În urma terapiei citotoxice, se constată anomalii în grupele cromosomiale 5 și 7, ca și în cazul leucemiilor tratate. Unii autori au observat cromozom Phl în policitemia vera, considerându-l propriu sindromului mieloproliferativ (18, 19).

LIMFOPROLIFERĂRILE MALIGNE

Limfoamele maligne se deosebesc și prin capacitatea lor de multiplicare.

Ciclul celular are variații mari, realizând uneori indici mitotici reduși. De aceea în unele cazuri cum sunt leucemia limfatică cronică (LLC) și boala Hodkin, analizele citogenetice identifică numai cariotipuri normale. Ele reprezintă celulele limfocitare reactive din tumoare și nu clona malignă. Tehnicile de studiu perfecționate au crescut frecvența anomaliilor cromosomiale observate și în aceste cazuri.

În leucemiile acute limfoblastice și în unele limfoame nonHodgkin s-au identificat anumite clone specifice, având implicații prognostice. Acestea cuprind în mod preferențial cromosomi din grupele 14, 8, 2, 22, și 18, cu rupturi ce se repetă la anumite benzi (tabelul 19.IV).

În aceste regiuni tehnicile de genetică moleculară au localizat, pe de o parte, genele ce codifică lanțurile grele și ușoare ale moleculelor de Ig și TCR, iar pe de altă parte, o serie de protooncogene. În limfoamele B sunt frecvente rupturile în zonele pentru lanțuri grele Ig:14q32, pentru lanțuri ușoare lambda: 22q11, pentru lanțuri ușoare kappa: 2p11, iar în limfoamele de origine T se repetă ruptura la 14q11 unde se localizează *gena* lanțurilor alfa ale TCR. În remanieri este posibil să se includă aceleași secvențe genice care sunt folosite în recombinarea normală a segmentelor V-D-J ale Ig sau TCR în timpul limfopoiezei (15). În rearanjările clonale maligne se realizează translocații reciproce în care se alătură protooncogene de locurile genelor de Ig și respectiv TCR. În aceste regiuni se află secvențe genice amplificatoare ce pot crește nivelul transcripției și altor gene de pe același cromosom. Ele funcționează în raport cu etapa de diferențiere limfocitară. În limfoamele B, în etapele bine diferențiate, elementele amplificatoare activează transcripția unidirecțional de la capătul 5′, cuprinzând zone mari; iar în etapele slab diferențiate, ele activează bidirecțional, dar pe o arie mai mică. Așadar pentru realizarea transformării maligne (a limfoamelor B), în afară de producerea translocației, un rol determinant îl are etapa de diferențiere a celulei B respective (8). Modelul activării genice este ilustrat de limfomul Burkitt, cu celule fenotipic bine diferențiate, ca și de limfomul folicular sau difuz cu celule limfoblastice slab diferențiate.

Limfoproliferări maligne: rearanjări cromosomiale — gene — prognostic

Translocații specifice	Gene localizate	Subtip leuc. limf.	Vârstă clinic	Morfologie Fenotip	Frecvență cazuri %	Prognostic
hiperdiploid 30—55		LAL**1	copii nr. n leuc.	nonT nonB	40	favorabil
del (6) (q21—25)	MYB	LAL 2	copii	nonT nonB	—	favorabil
t(1; 9) (q23; p13)		LAL 1		CALLA + cyIgM +		nefavorabil
t(1; 19) (q23; p13) cu hiperdipl.		LAL 1		pre-B	30	nefavorabil
t(9; 22) (q34; q11)	BCR/ABL	LAL 1, 2	adulți copii	DR+, CALLA +	20 3	nefavorabil
t(4; 11) (q21; q23)	RAF/EST 1	LAL 2	copii leuco+ splmeg.	pre-B+ monocit	5	nefavorabil
t(11; 14) (q23; q32)	EST/Ig	LAL 2		nonT, nonB	ND	—
t(8; 14) (q24; q32)	MYC/IgH	LAL 3 Burkitt		B	75	nefavorabil
t(8; 22) (q23; q11)	MYC/IgL	Burkitt		B	16	nefavorabil
t(2; 8) (p11; q24)	MYC/IgK	Burkitt		B	9	nefavorabil
t(14; 18) (q32; q21)	BCL2/IGH	L.* folic., difuze		cel. mici clivate CALLA ±	60—100	intermed.
t(2; 18) (p11; q21)	BCL2/IgK	L.* folic., difuze		„	10	nefavorabil
t(18; 22) (q21; q11)	BCL2/IgL	L. B, LLC*** B		CD5+	5	intermed.
t(11; 14) (q13; q32)	BCL1/Ig	L. B, LLC*** B	extra-nodal		—	—
t(11; 14) (p13; q11)	TCL-2 TCR A	L. T.	copii	E+		nefavorabil
t(8; 14) (q24; q11)	MYC/ TCR A	L. T.		E+		nefavorabil
(14) (q32)+	TCL-1	ATL****	tineri adulți	E+		nefavorabil
inv.(14) (q11; q32)	TCL-1/ TCRA	ATL	tineri adulți	E+		nefavorabil
(6) (q)—		L. B celule mari		B impl.		nefavorabil
tris.(12)		LLC B	adulți	CD5+		nefavorabil

* L = limfom
** LAL = leucemie acută limfoblastică
*** LLC = leucemie limfatică cronică
**** ATL = leucemie cu celule T a adultului.

LEUCEMIA ACUTĂ LIMFOBLASTICĂ

Studii pe un număr mare de cazuri indică o frecvență de 65—80% de cazuri cu anomalii cromosomiale clonale. Sunt observate anomalii numerice sau/și structurale. Primele cuprind: hiperploidii cu peste 50 de cromosomi, trisomii în grupele 21, 6, 8, 18 și monosomii 7 și 20, foarte rar hipodiploidii. Hiperploidiile se întâlnesc la 10—30% din cazuri, mai mult la copii; ele au un fenotip non-B, non-T, evoluează cu cifre normale ale leucocitelor, cu remisiuni durabile și cu durată de viață mai îndelungată.

Anomaliile de structură cuprind deleții ale brațului lung în cromosomul 6q- și ale brațelor scurte ale grupelor 9p- și 12p-, ca și numeroase translocații ce cuprind grupele 15, 8, 11, 4. Ultimele se însoțesc de un prognostic defavorabil.

Unele translocații se corelează frecvent cu subgrupe FAB sau cu anumite fenotipuri. Se menționează:

t(8; 14) (q24; q32) — LAL3 — leucemie Burkitt;

t(1; 9) (q23; p13) — LAL1 — fenotip CALLA+, cyIgM+.

Identificată mai mult la adulți (20%) decât la copii (3%) este translocația t(9; 22) (q34; q11), asemănătoare cu cea din LGC, dar diferită de aceasta din punct de vedere genic. Uneori ea se însoțește și de alte anomalii cromosomiale, cum este plus în grupa 8. Bolnavii au leucocitoză importantă și timp mediu de supraviețuire redus.

Altă translocație tipică ce cuprinde peste jumătate din cazuri copii de un an este t(4; 11) (q21; q23). Celula malignă are proprietăți de progenitor, ca fenotip TdT+; CALLA— și potențial de dezvoltare *in vitro* spre două linii celulare: pre-B și monocit. Boala se însoțește de leucocitoză mare și are un prognostic grav.

LIMFOAMELE MALIGNE NON-HODGKIN

A fost notată o frecvență de 90% clone anormale, cuprinzând anomalii cromosomiale complexe. Între acestea se remarcă frecvența rearanjărilor grupei 14 cu puncte de rupere diferite în limfoamele B numai la q32, iar în limfoamele T la q11, alături și de q32.

Unele anomalii se asociază specific cu subtipurile histologice, dintre care se amintesc cele mai bine cunoscute.

LIMFOMUL BURKITT

Manifestat uneori și leucemic, are morfologie L3, poate fi endemic virotic sau neendemic. Se caracterizează prin trei translocații reciproce, din care la 75% din cazuri este prezentă varianta t(8; 14) (q24; q32), iar la 25% din cazuri se întâlnesc două variante: t(8; 22) (q24; q11) și t(2; 8) (p12; q24) (fig. XIX.5). În toate aceste translocații este inclus cromosomul 8 rupt la q24, delimitând segmentul de localizare al oncogenei MYC, care este recombinantul critic.

Oncogena MYC se alătură de capătul 5′ al genelor pentru regiunile constante ale lanțurilor grele Ig. Oncogena MYC se poate rupe la diferite niveluri, translocându-se pe cromosomul 14 cu toți trei exonii sau numai cu 2 și 3. În ambele cazuri exonul 2 codifică aceeași proteină MYC cu funcție în proliferarea celulară. În cazul translocațiilor variante, oncogena MYC rămâne pe cromosomul 8, alăturându-se la fragmentele rupte de pe cromosomii 22 respectiv 2, ce conțin genele porțiunilor constante

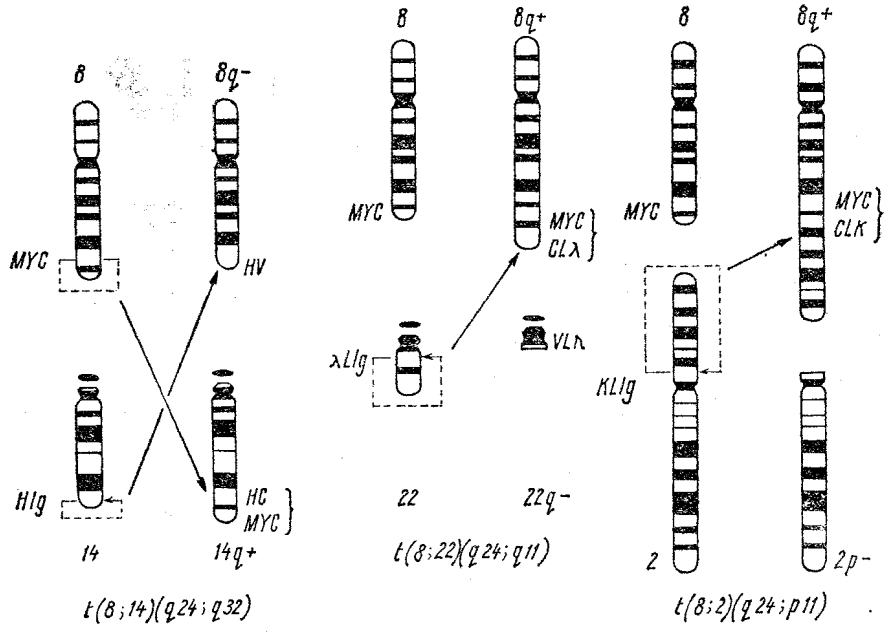


Fig. XIX.5. — Schema translocației principale și a celor două variante din limfomul Burkitt.

ale lanțurilor ușoare Ig. Aceste segmente genice conțin secvențele amplificatoare ce funcționează în etapa diferențiată a limfopoiezei B, preiau comanda și asupra oncogenei MYC și induc niveluri crescute de oncoproteină (7).

LIMFOAMELE FOLICULARE

Au celule maligne clivate cu fenotip B, CALLA+. În proporție mai mică aceste caractere se regăsesc în limfoamele difuze de origine foliculară. Caracteristică acestor celule este translocația reciprocă între cromosomul 14 și cromosomul 18 t(14; 18) (q32; q21) prezentă la 60—80% din cazuri și absentă în alte tipuri de limfoproliferări. Pe brațele lungi ale cromosomului 18 este plasată oncogena BCL2 (B *cell limphoma/leukaemia),* care se rupe într-un număr mic de puncte și segmentul se translocă pe cromosomul 14 rupt la nivelul genelor lanțurilor grele Ig. Când acest rearanjament se produce într-o etapă timpurie a diferențierii B, segmentele genice amplificatoare de pe cromosomul 14, acționând în dublu

sens pe distanțe mici, cuprind și activează și gena BCL2. Produsul normal al acestei gene este o proteină cu greutate moleculară 26 kd, care se găsește pe membrana internă mitocondrială și are rol în menținerea supraviețuirii celulare, blocând moartea programată (apoptoza). În urma translocației respective, produsul BCR-2 este supraexprimat (8). Ca și în limfomul Burkitt, și în cazul limfoamelor foliculare se constată translocații variate ce cuprind cromosomul 18 cu oncogena BCL-2 și grupul 2 ce conține genele lanțurilor ușoare kappa de Ig: t(2; 18) (p11; q21). În limfoamele cu celule mari, de origine foliculară, pe lângă translocația clasică se adaugă și alte anomalii, ca supranumerar 7 deleție 6q—. Acestea indică un grad mai mare de malignitate (4, 1) Aneuploidia clonală poate fi accentuată și diferită după caz. (fig. XIX.6).

LEUCEMIA LIMFATICĂ CRONICĂ

Are o rată redusă a mitozelor, iar când acestea se obțin în peste 50% din cazuri sunt normale. Pentru a detecta clonele maligne este preferabil să se efectueze studiul citogenetic pe țesut ganglionar. Se pot face și culturi de sânge periferic, dar cu stimulenți B și interval de cultură de 5—7 zile (22).

Caracteristic pentru această leucemie este trisomia 12, considerată de unii autori ca semn de prognostic nefavorabil. Această trisomie se găsește și în alte limfoproliferări fără a fi consemnată aceeași semnificație prognostică. Relativ frecvent se întâlnesc rearanjamente ale cromosomului 14q32 sub formă de translocație cu grupul 19: t(14; 19) (q32; q13).

Într-un mic număr de cazuri se observă, ca și în limfomul limfocitic, varianta translocării genei BCR-2 de pe cromosomul 18 alături de genele lanțului ușor lambda Ig: t(18; 22) (q21; q11).

În 10% din cazurile de LLC se găsește un cromosom recombinant critic nr. 11 cu punct de rupere în q13, unde este localizată protooncogena BCL-1 care migrează pe cromosomul 14, în translocația t(11; 14) (q13; q32).

MIELOMUL MULTIPLU ȘI LEUCEMIA PLASMOCITARĂ

Sunt greu de studiat citogenetic, deoarece se obțin puține metafaze. Numai 25%—50% din cazuri au anomalii clonale. În mielom se găsesc frecvent plusuri în grupele 9 și 11 și foarte rar pierderi ale cromosomilor 13, X și Y. În puținele cazuri de leucemie plasmocitară studiate, se detectează anomalii ale cromosomului 1 ca 1q+, deleția brațului lung al cromosomului 14 la q32 și translocații ce interesează cromosomul 11q11—13.

LIMFOPROLIFERĂRILE T

În prezent au fost localizate genele ce codifică lanțurile polipeptidice ale receptorului T (TCR) astfel: lanțul alfa pe cromosomul 14q11, lanțul beta pe cromosomul 7q31—36 și lanțul gamma pe cromosomul 7p15. Aceste regiuni sunt incluse frecvent în anomaliile clonale din

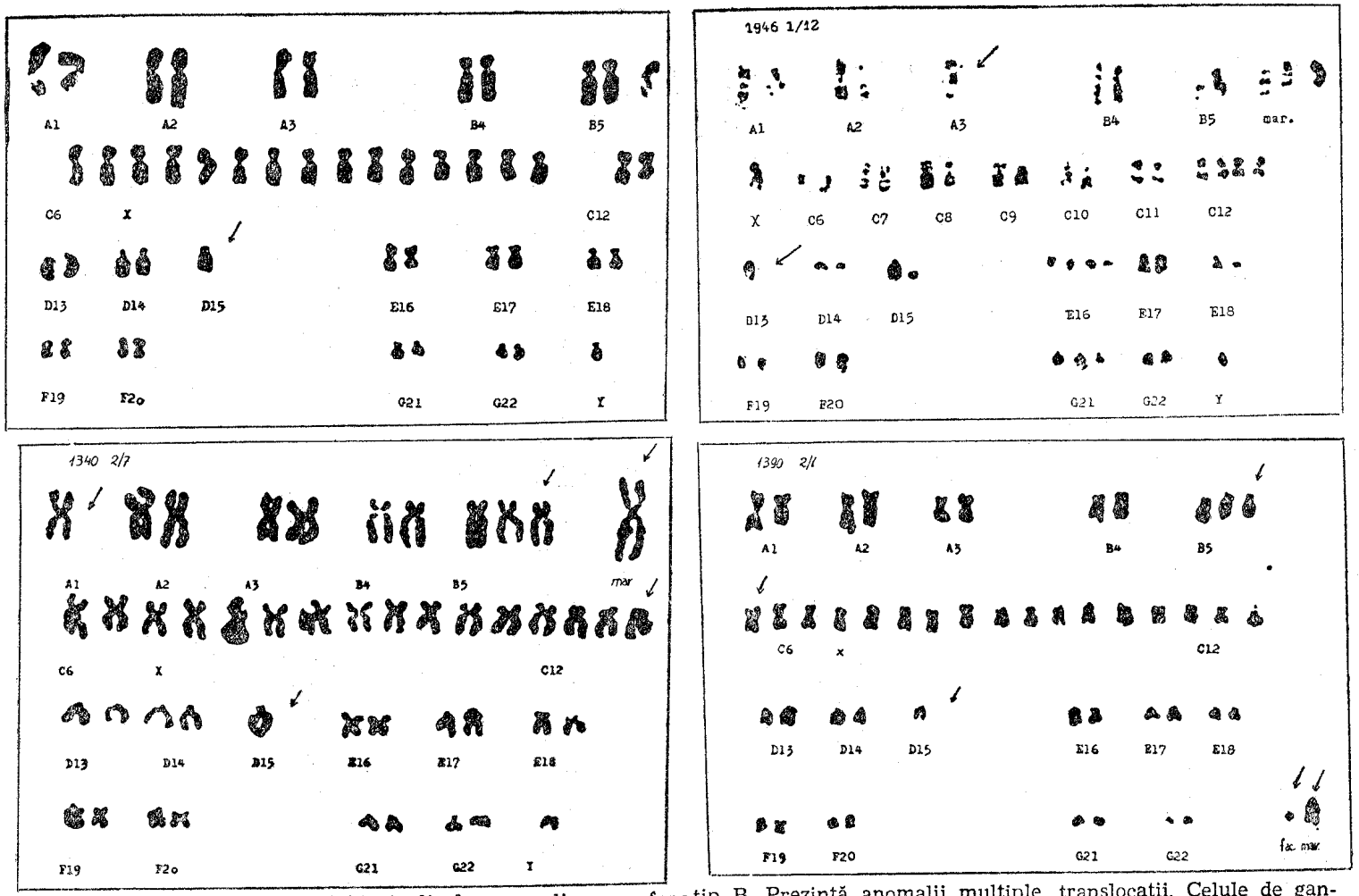


Fig. XIX.6. — Clone aneuploide în limfoame maligne cu fenotip B. Prezintă anomalii multiple, translocații. Celule de ganglion limfatic.

limfoproliferările T maligne. În unele cazuri se adaugă rearanjamente conținând cromosomul 14q32, regiune unde sunt localizate genele lanțurilor grele ale moleculei de Ig. Recent s-a identificat și este studiată o protooncogenă TCL-1.

În majoritatea leucemiilor sau limfoamelor T anomalia clonală cel mai des întâlnită cuprinde cromosomul 14q11 ca ruptură, inversie sau translocație.

În leucemia acută limfoblastică T se menționează diferite translocații dintre care semnificative sunt următoarele: t(11; 14) (p13; q11) și t(8; 14) (q24; q11). În aceasta din urmă, ruptura de pe cromosomul 8 cuprinde oncogena MYC ce se alătură de secvența genelor TCR, în mod analog cu translocația variantă din limfomul Burkitt.

În leucemia-limfom T a adultului din Japonia, boală virotică, se detectează în numeroase cazuri rupturi la cromosomul 14q11 cu eventuale rearanjamente. Unii autori au urmărit un caz pe tot parcursul evoluției, care pe baza anomaliei inițiale: inv14 (q11; q32) dezvoltă în timp o evoluție clonală cu pierderea cromosomului sexual Y și deleție la cromosomul 1q— (29).

BOALA HODGKIN

Celula Paltauf-Sternberg are rata mitozelor foarte redusă, astfel că studiul citogenetic al acestei boli este dificil. Din analiza citogenetică a țesutului ganglionar tumoral, se obțin în majoritate cariotipuri normale, reprezentând celulele reactive. În rare cazuri s-au detectat metafaze hiperploide (peste 56), triploide sau pseudotetraploide (84—86 cromosomi). Identificarea unor cromosomi markeri în peste două metafaze indică prezența de clone anormale (fig. XIX.7). Remanierile cromosomiale cuprind

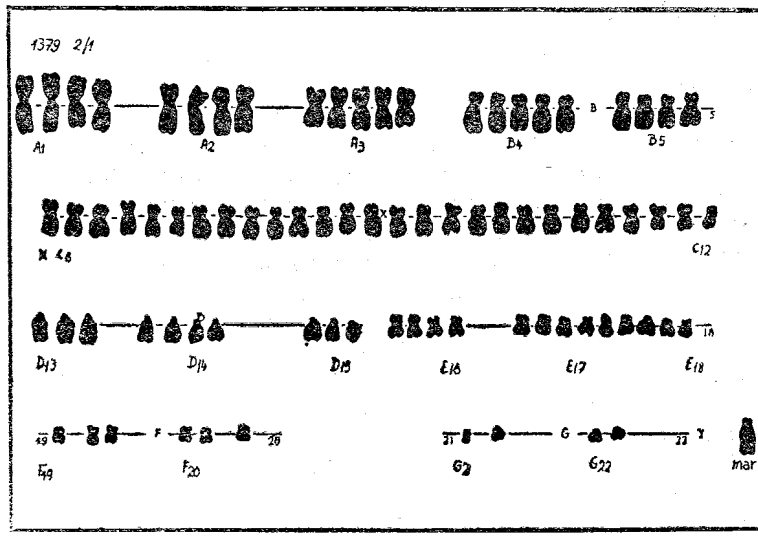


Fig. XIX.7. — Clonă pseudotetraploidă în boala Hodgkin. Celulă ganglion limfatic.

cel mai frecvent cromosomii 11q23 și 7p, 1p. S-au observat și translocații în care sunt implicați cromosomii 14q32, 8q24 ca și în cazul limfomului Burkitt, dar și grupul 6q11. Prezența rupturilor la nivelul localizării unor oncogene nu a dat curs unor studii mai ample care să dovedească rolul acestora în patogenia bolii (6).

Din 7 cazuri de boală Hodgkin la debut, autorii au identificat în țesutul tumoral ganglionar numai un caz cu cariotip normal, restul pseudotriploide sau pseudotetraploide dintre care două cazuri cu clone anormale (24).

Analiza citogenetică s-a dezvoltat în mod deosebit în ultimele decenii, reprezentând în prezent unul din cele trei criterii importante de caracterizare a celulei hematopoietice maligne. Dacă în cercetările citogenetice de început se discuta dacă anomaliile cromosomiale sunt determinante sau numai epifenomene ale bolilor maligne, în prezent frecvența asocierii unor rearanjamente clonale cu subtipuri de leucemii, identificarea de oncogene la punctele de rupere, cunoașterea modului lor de activare, ca și funcțiile produselor de codare, încep să dovedească rolul anomaliilor cromosomiale în procesul transformării maligne.

BIBLIOGRAFIE

1. AISENBERG A. C., WILKES B. M., JACOBSON J. O.: Blood 1988; 71: 969.
2. AUERBACH A. D.: Leukemia 1992: 6 (suppl. 1): 1.
3. BERGER R.: Rev. Europ. Clin. Biol. 1970; 15: 1000.
4. BERTHEAS M. F.: LEYEA 1992; 8: 197.
4a. CLEARY L. M., și colab.: New Engl. J. Med. 1993; 329: 858.
5. COLIGNON J.: Méd. Hyg. 1991; 1 913: 3 411.
6. CREBOUILLAS F. și colab.: Blood 1988; 71: 1 615.
7. CROCE C. M., KLEIN G.: Blood 1985; 65: 54.
8. CROCE C. M., NOWELL P. C.: Blood 1985; 65: 1.
9. CULLOCH MC. E. A.: New Approaches to the Treatment of Leukemia. Springer Vlg, 1990.
10. FEINSTEIN E. și colab.: Leukemia 1992; 6 (suppl. 1): 37.
11. GALE R. P., BUTTURINI A.: Leukemia 1992; 6 (suppl. 1): 80.
12. GROUCHY DE J. și colab.: Nouv. Rev. Fr. Hématol. 1965; 5: 565.
13. GROUCHY DE J. și colab.: Amer. J. Hum. Genet. 1966; 18: 485.
14. HAASE D. și colab.: LEYEA 1992; 8: 3.
15. LE BEAU M. M., ROWLEY J. D.: În Williams W. J. (ed.): Haematology, 1990, I.
16. LEJEUNE J.: Wistar Inst. Symp. 1965; 4: 197.
17. LEVINE E. G. și colab.: Ann. Int. Med. 1988; 108: 14.
18. NICOARĂ S., BUTOIANU E., BROȘTEANU R.: Lancet 1967; 2: 312.
19. NICOARĂ S., BUTOIANU E., GINGOLD N.: Rev. Roum. Méd. Int. 1977; 15: 57.
20. NOWELL P. C., HUNGERFORD D. A.: Science 1960; 132; 1 497.
21. NOWOTNY H. și colab.: Fol. Haemat. 1988; 115: 781.
22. PANODLFI P. P. și colab.: EMBO J. 1992; 11; 1 397.
23. PETERSON R. D. A. și colab.: Leukemia 1992; 6 (suppl. 1): 8.
24. RĂILEANU-MOȚOIU IOANA și colab.: Rev. Roum. Méd. Int. 1976; 14: 115.
25. RĂILEANU-MOȚOIU IOANA și colab.: Rev. Roum. Méd. Int. 1968; 5: 413.
26. RĂILEANU-MOȚOIU IOANA și colab.: Rev. Roum. Méd. Int. 1969; 6: 267.

27. RĂILEANU-MOȚOIU IOANA, BERCEANU S.: Stud. Cercet. Med. Int. 1971; 12: 537.
28. ROWLEY J. D. și colab.: Blood 1982; 59: 1013.
29. SADAMORI N. și colab.: LEYEA 1992; 6: 177.
30. WOLF S., SCOTT D.: Exp. Cell Res. 1969; 55: 9.
31. YUNIS J. J., BLOOMFIELD C. D., ENSRUD K.: New Engl. J. Med. 1981; 305: 135.
32. XX Coop. Study Group: Morphol. Immunol.: Cytogenet, working classif. of acute myeloid leuk., Brit. J. Haemat. 1988; 68: 487.
33. XX I.S.C.N.: An Intern. Syst. for Hum. Cytogenet. Nomencl. Resolution banding. Cytogen. Cell Genet. 1981; 91: 1.
34. XX I.S.C.N.: Intern. Syst. for Hum. Cytogenet. Nomencl. Birth Defects, 1985. 1/21 Nation. Found. N.Y.

XX

ANEMIILE. GENERALITĂȚI, CLASIFICARE

DAN COLIȚA

Anemia este una din situațiile cele mai frecvent întâlnite în practica medicală. Este un semnal pentru o boală sau pentru un mecanism de boală. Constatarea existenței unei anemii trebuie să incite, în mod obligatoriu, la rezolvarea următoarelor probleme: 1) care sunt caracteristicile morfologice ale anemiei?; 2) care este mecanismul care a provocat anemia?; 3) care este cauza (sau boala) care a declanșat mecanismul provocator de anemie?; 4) care este tratamentul cel mai potrivit?

Semnalul clinic, care sugerează existența unei anemii, este paloarea tegumentelor și a mucoaselor. Paloarea nu este însă un semn fidel pentru anemie întrucât este prezentă și în stările însoțite de creșterea volumului plasmatic (hiperhidratare, sarcină, splenomegalie, macroglobulinemie). Deoarece în aceste situații volumul eritrocitar total rămâne normal (♂ 36 ml/kg; ♀ 32 ml/kg) ele sunt denumite pseudoanemii sau anemii relative.

Anemia este definită în practica curentă prin scăderea valorilor parametrilor care apreciază cantitatea de eritrocite din circulație; numărul, volumul (hematocritul) și conținutul lor în hemoglobină. De aceea hemograma reprezintă investigația primară obligatorie în toate situațiile în care se bănuiește prezența unei anemii.

În tabelul 20.I sunt reproduși parametrii eritrocitari normali pentru adulții de ambele sexe. Acești parametri oferă cele 5 tipuri de date necesare clasificării anemiilor: 1) cantitatea eritrocitelor existente în circulație (numărul de eritrocite, hematocritul — volumul eritrocitar procentual, cantitatea de hemoglobină dintr-un decilitru de sânge); 2) mărimea eritrocitelor (VEM=volumul eritrocitar mediu); 3) încărcarea cu hemoglobină a eritrocitelor (HEM=hemoglobina eritrocitară medie; CHEM=concentrația medie a hemoglobinei din eritrocite); 4) producția de eritrocite de către măduva osoasă (reticulocitoza); 5) variația dimensiunilor eritrocitelor (RDW).

În tabelul 20.II sunt prezentate formulele de calcul ale indicilor eritrocitari (VEM, HEM, CHEM), utilizate în determinările tradiționale. În prezent aceste constante sunt determinate concomitent de mașini automate, rapid și cu un grad mare de precizie.

TABELUL 20.I

Parametrii eritrocitari normali

	♂	♀
Nr. Eritrocite ($\times 10^6$/mm^3)	4,3— 5,5	3,7— 4,9
Hematocrit (%)	40,5—52,5	36—46
Hemoglobină (g/dl)	13—17	11—14,6
VEM (fl)*	80—94	
HEM (pg/celulă)**	25—33	
CHEM (g/dl)	32—36	
Reticulocite (%)	0,5— 2	
RDW %***	12,5± 1	

* fl = femtolitru = 10^{-15}l
** pg = picogram = 10^{-12}g
*** RDW = *red cell distribution width*

Parametrii eritrocitari. Evaluarea cantitativă a eritrocitelor din circulație permite o primă apreciere a gradului anemiei și servește ulterior pentru urmărirea dinamică a evoluției postterapeutice. Dacă se ia (de exemplu) drept criteriu de apreciere cifra de hemoglobină (Hb), anemia poate fi clasificată ca ușoară (Hb=10—12 g/dl), moderată (Hb=7—10 g/dl) sau severă (HB<7 g/dl). Această apreciere este doar orientativă deoarece gravitatea anemiei este dictată în special de intensitatea exprimării sale clinice și de caracterele bolii de bază. Sindromul anemic este mai șters sau mai zgomotos în funcție de rapiditatea instalării anemiei, de vârsta pacientului și de starea funcțională a aparatului său cardiovascular. Anemia care se instalează lent poate rămânea asimptomatică chiar și la

TABELUL 20.II

Formulele de calcul ale indicilor eritrocitari (5)

$$VEM = \frac{\text{Ht (\%)}}{\text{Nr. Er. } (\times 10^6/\mu L)} \times 10$$

$$HEM = \frac{\text{Hb (g/dl)}}{\text{Nr. Er. } (\times 10^6/\mu L)} \times 10$$

$$CHEM = \frac{\text{Hb (g/dl)}}{\text{Ht (\%)}} \times 100$$

valori destul de mici ale hemoglobinei. În aceste condiții volumul sanguin total este corectat permanent la valori normale și are loc o adaptare destul de bună a organismului bolnavului la hipoxie. Ea constă din ajustarea curbei disocierii Hb și din creșterea travaliului cardiac. În anemii crește cantitatea de 2,3-difosfoglicerat eritrocitar și aceasta mediază o eliberare mai lesnicioasă a oxigenului de către oxihemoglobină ce poate

spori oxigenarea tisulară cu până la 30% (3). Prin creşterea travaliului cardiac, eritrocitele sunt vehiculate într-un tempo mai rapid între plămâni şi ţesuturi. Fenomenul este favorizat de reducerea viscozităţii sângelui (consecinţă a scăderii hematocritului) şi este limitat de capacitatea de performanţă a cordului. Semnele care exprimă atingerea limitelor adaptabilităţii cardiace sunt palpitaţiile, dispneea de efort şi suferinţa cerebrală secundară anoxiei (ameţeli, cefalee şi acufene).

Indicii eritrocitari. Anemiile sunt clasificate în general după 2 criterii: morfologic şi funcţional. Clasificarea morfologică a anemiilor se bazează pe aprecierea mărimii, formei şi a gradului de încărcare cu Hb a eritrocitelor. Aprecierea acestor aspecte necesită studiul frotiului de sânge şi calcularea indicilor eritrocitari (vezi tabelele 20.I şi 20.II). Încadrarea morfologică a anemiilor poate sugera unele mecanisme de boală, ceea ce permite dirijarea investigaţiilor ulterioare către un anumit grup de factori etiologici. Peste 80% din anemii pot fi descifrate corect prin examinarea frotiului de sânge. După criteriile morfologice anemiile pot fi împărţite în normocitare, macrocitare, microcitare, normocrome şi hipocrome, iar corelarea aspectelor morfologice cu valorile indicilor eritrocitari aduce un plus de precizie pentru stabilirea acestor tipuri de anemie (tabelul 20.III).

TABELUL 20.III

Clasificarea morfologică a anemiilor (1)

	VEM (fl)		CHEM (g/dL)	Sugestii etiopatogenice
Normocitară	80—93	Normocromă	32—36	Insuficienţă medulară, sângerare acută, hemoliză, leucemii, neoplasme solide, insuficienţă renală cronică
Macrocitară	>94	Normocromă	32—36	Anemii megaloblastice carenţiale şi noncarenţiale, anemii macrocitare nonmegaloblastice (boala cronică de ficat, mielodisplazice, mixedem)
Microcitară	<80	Hipocromă	<30	Carenţa de fier, anemia cronică simplă (inflamaţii cronice, infecţii cronice, neoplasme), talasemii, anemii sideroblastice, unele hemoglobinopatii

Morfologia eritrocitară. În anumite circumstanţe unele înfăţişări mai particulare ale eritrocitelor pot fi revelatoare pentru un mecanism sau o boală: *eritrocitele în semn de tras la ţintă* sunt celule hipocrome în care Hb este dispusă numai în centru şi pe margini; se observă cu precădere în talasemii şi în carenţa marţială, dar şi în hemoglobinozele C şi S, în icterul obstructiv şi în deficienţa LCAT (lecitincolesterol acil transferază); *eliptocitele (ovalocitele)* apar în unele anemii carenţiale (de exemplu carenţa de catalizatori — vitamină B_{12} sau acid folic) şi în unele anemii hemolitice ereditare (eliptocitoză, talasemie); *sferocitele* apar într-o va-

rietate largă de situații în care au loc alterări ale membranei sau agresiuni asupra membranei eritrocitare (sferocitoza ereditară, anemii hemolitice imune, anemii hemolitice cu corpi Heinz, unele hemolize provocate de medicamente, după arsuri întinse, hipersplenism, hipofosfatemie severă); *stomatocitele* (eritrocitele în formă de cupă) apar în etilismul cronic, boala cronică de ficat, după antihistaminice, fenotiazine, propranolol; *echinocitele* (hematii crenelate) se observă în uremie, carcinom gastric, deficiența de piruvat kinază; *acantocitele* (hematii spiculate) însoțesc ciroza alcoolică și abetalipoproteinemia ereditară; *dacriocitele* (eritrocite în picătură) apar în metaplazia mieloidă cu mielofibroză, în talasemii și în anemii mieloftizice; *schizocitele* (eritrocite fragmentate) semnalează o mutilare mecanică a eritrocitelor: anemii hemolitice microangiopatice (în cadrul sindromului de coagulare intravasculară diseminată; al purpurei trombotice trombocitopenice, al unor forme de vasculită sau de glomerulonefrită), apar la protezații valvulari, în hemoglobinuria de marș, după arsuri severe; *drepanocitele* (eritrocite în formă de seceră sau falciforme) sunt caracteristice pentru siclemie; *eritrocitele cu corpi Jolly* se observă în diseritropoieze, asplenie (de exmplu în cadrul „autosplenectomiei" care survine în cursul evoluției siclemiei) sau după splenectomie; *eritrocitele* cu punctații bazofile apar în diseritropoieze, saturnism, talasemie.

Hipocromia este un semnal al scăderii producției de hemoglobină. Acest defect poate fi urmarea unei încorporări scăzute a fierului în inelul protoporfirinei (defect în formarea hemului) sau a scăderii sintezei unor specii de globină. Sinteza defectuoasă a hemului poate fi consecința lipsei fierului din organism (carența marțială), a proastei aprovizionări cu fier a eritroblaștilor, cu stocarea fierului în macrofagele medulare (anemia cronică simplă) sau a blocării fierului în peretele mitocondriilor (anemii sideroblastice). Dezechilibrarea sintezei lanțurilor de globină reprezintă tulburarea centrală a talasemiilor. Anemia prin carență de fier, anemia cronică simplă și talasemiile sunt tipurile de anemie cele mai răspândite de pe glob.

Determinările reticulocitelor. Clasificarea funcțională a anemiilor se referă la aprecierea producției de eritrocite din măduva osoasă. Producția eritrocitelor este apreciată din hemogramă după reticulocitoză. Reticulocitele sunt eritrocite tinere cu diametrul mai mare decât cel al eritrocitelor adulte, care mai păstrează în citoplasmă ribosomi și ARNm, pe baza cărora sintetizează în continuare hemoglobină. Din aceste două motive ele apar pe frotiul de sânge colorat cu Giemsa sub aspectul unor macrocite policromatofile. Măduva normală produce în 24 de ore circa 90×10^6 reticulocite/l, ceea ce reprezintă cam 0,5—1,5% din eritrocitele circulante. În anemiile severe aceste procente necesită o corecție pentru care se utilizează următoarea formulă de calcul:

$$\%\,\text{Ret} \times \frac{\text{Hematocritul bolnavului}}{45\%\ (=\text{hematocritul ideal})}$$

În funcție de cifra de reticulocite anemiile se împart în „regenerative" (cu hiperreticulocitoză) și „hiporegenerative" (cu reticulocitopenie). Reticulocitoza este oglinda activității eritroformatoare a măduvei, atât în

sens cantitativ, cât și în cel al eficienței acestui proces. Asocierea reticulocitozei la anemie arată că mecanismul acesteia este periferic (sângerare sau hemoliză). Dimpotrivă, reticulocitopenia indică faptul că anemia este rezultatul unui defect medular (anemie de cauză centrală). În aceste situații, examinarea imediată a măduvei osoase este obligatorie. O apreciere suplimentară a producției de eritrocite la bolnavul anemic o aduce *indicele de producție al reticulocitelor:* raportul dintre cifra corectată a reticulocitelor și timpul lor de maturație în sânge. Maturația reticulocitelor durează în medie 3 zile. La indivizii normali, primele două-treimi din acest timp de maturație se desfășoară în măduvă și se continuă încă 24 de ore după trecerea în sânge a reticulocitelor. La individul anemic, reticulocitele sunt expulzate mai rapid în sânge, cu atât mai devreme cu cât anemia este mai severă. Aceste reticulocite foarte imature au fost denumite „reticulocite de stres". Ele sunt mai mari și mai policromatofile decât cele care apar în condiții normale. În plus, „reticulocitele de stres" au volum mai mare și o cantitate de hemoglobină corespunzător mai mare. Ele își vor pierde excesul de citoplasmă pe măsură ce se maturează (8). Prin urmare, la anemici timpul necesar maturării reticulocitelor circulante va fi cu atât mai lung cu cât anemia este mai accentuată. Valorile standard, acceptate pentru fiecare treaptă de hematocrit și necesare pentru calculul indicelui de producție sunt următoarele (2):

Ht%	*Maturație (zile)*
45	1,0
35	1,5
25	2,0
15	2,5

$$\text{Indicele de producție} = \frac{\text{Ret\%} \times \frac{\text{Ht. real}}{\text{Ht. ideal}}}{\text{T. de maturație}}$$

Valorile mai mari de 3 indică hiperregenerarea. Este de notat că unele evenimente asociate (infecții, inflamații) influențează în sens negativ producția. Un indice mai mic de 2 indică o hiporegenerare și se asociază cu reticulocitopenie. Reticulocitopenia este un semnal periferic pentru două procese fiziopatologice medulare: scăderea producției și ineficiența producției de eritrocite. La examinarea măduvei osoase producția de globule roșii poate fi estimată dacă se raportează precursorii eritroizi (E) la cei granulocitari (G) (raportul (G/E).

În defectul de producție, seria eritroblastică este hipoplazică. Hipoplazia eritroidă poate fi, *rareori,* izolată (eritroblastopenie pură — constituțională sau dobândită) sau, *frecvent,* expresia unei afectări globale a măduvei osoase (insuficiență medulară). Cauzele importante ale insuficienței medulare sunt: anemia aplastică și dislocarea țesutului hematopoietic prin: *celule neoplazice* (metastaze carcinomatoase hemopatii maligne), *fibroză* (metastaze, leucemie acută megacarioblastică, mielom sclerogen, boli mieloproliferative cronice, leucemie cu celule păroase, tuberculoză, histoplasmoză, osteopetroză, expunerea la benzen sau la radiații ionizante), *necroză* (metastaze, siclemie). Unele din situațiile enumerate (invaziile neoplazice, infecțiile severe) pot determina un răspuns

leucoeritroblastic al sângelui (coexistența de eritroblaști cu precursori granulocitari imaturi), fapt ce ajută la orientarea diagnosticului cauzal.

În mod normal raportul G/E este 3/1 sau 4/1. Atunci când efortul de producție este mare, raportul G/E scade sau chiar se inversează, iar examinarea frotiurilor medulare evidențiază o hiperplazie marcată a seriei eritroide. Dacă procesul este eficient, el se traduce prin formarea și eliberarea unui număr mare de reticulocite. Dacă eritropoieza este ineficientă, cea mai mare parte a eritroblaștilor care se formează sunt distruși prematur, iar efortul de regenerare nu se finalizează decât parțial printr-o formare redusă de reticulocite (fig. XX.1).

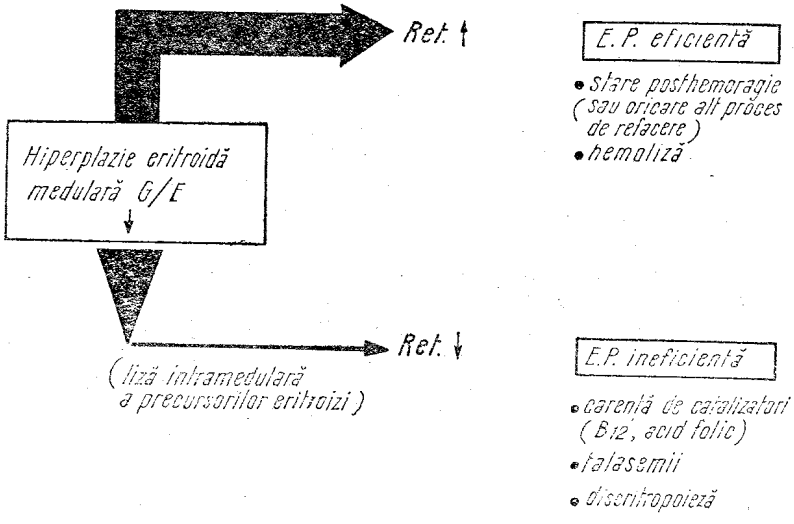


Fig. XX.1. — Aprecierea eficienței eritropoiezei (EP).

Ineficiența eritropoiezei se poate asocia cu *transformare megaloblastică* (de exemplu în carența de vitamină B_{12} sau de acid folic) sau cu aspecte de *diseritropoieză*, o tulburare particulară a eritropoiezei, caracterizată prin multiple anomalii morfologice ale eritroblaștilor: multinuclearitate, kariorhexis (fragmentare nucleară), polilobulare nucleară (eventual lobii apar uniți prin punți filamentoase), mitoze atipice, citoplasmă cu vacuole sau cu punctații bazofile, sideroblaști inelari (4).

Diseritropoieza este un fenomen de însoțire al mai multor situații: boli dobândite ale celulelor stem hematopoietice (anemia aplastică, hemoglobinuria paroxistică nocturnă, anemia sideroblastică dobândită și alte afecțiuni mielodisplazice), tulburarea sintezei ADN (anemii megaloblastice), talasemii, paludism, anemii diseritropoietice congenitale.

Constatarea hiperreticulozitozei în hemograma unui subiect anemic pune problema diagnosticului diferențial între hemoliză și alte procese de regenerare activă (starea posthemoragie acută sau stările de refacere ale anemiilor carențiale după administrarea tratamentului adecvat). Hemoliza se identifică prin existența a 2 grupe principale de markeri: *biochimici*, care semnalează hiperdistrucția eritrocitelor (hiperbilirubinemia

indirectă — markerul degradării protoporfirinei — și descărcarea crescută de urobilinogen în urină) și *morfologici,* care semnalează hiperregenerarea compensatorie (hiperplazia eritroidă medulară și hiperreticulocitoza).

Creșterea titrului BRI și a eliminării urinare de Ubg sunt numai semnale pentru hemoliză și nu se corelează perfect cu intensitatea acesteia, deoarece ficatul normal are o mare capacitate de conjugare a bilirubinei (dacă ficatul este indemn, titrul BRI nu poate depăși 3 mg/dl oricât de mare ar fi intensitatea hemolizei). La fel, urobilinogenuria nu este decât un simplu indicator al *turnover*-ului pigmentului. Alți markeri generali ai hemolizei sunt creșterea titrurilor lacticodehidrogenazei (cu predominanța izoenzimei 2) și consumarea haptoglobinei libere din plasmă. Depistarea existenței hemolizei trebuie să incite la descifrarea mecanismului acesteia. Didactic, se separă 2 tipuri de hemoliză: *extravasculară* („intratisulară"), care este mediată de ingerarea și digestia eritrocitelor de către macrofagele din diverse teritorii (în principal cel splenic și hepatic — celulele Kupffer) și *intravasculară* (liza eritrocitelor în torentul sanguin). Toți cei 6 markeri descriși mai sus se întâlnesc atât în hemoliza extravasculară (care este mai frecventă în practică) cât și în cea intravasculară. Indicatorii specifici pentru un diagnostic rapid al hemolizei intravasculare sunt hemoglobinemia, hemosiderinuria și hemoglobinuria. Hemoglobinemia, este semnalată de culoarea roz a plasmei (observabilă, de exemplu, în tubul de hematocrit) și confirmată prin examen spectroscopic. Hemosiderinuria (descărcarea urinară de fier demonstrabilă citochimic) este un excelent test de apreciere, în special al formelor cronice. Hemoglobinuria (colorarea rubinie a urinii) este semnalul unui puseu de hemoliză intravasculară intensă și recentă. Diagnosticul de hemoliză trebuie completat în continuare cu cercetarea mecanismului fundamental al acesteia. Din acest punct de vedere, anemiile hemolitice se împart în 2 clase mari: cele provocate de defecte structurale ale eritrocitelor (anemii hemolitice corpusculare) și cele în care supraviețuirea eritrocitelor (care sunt normale) este compromisă de agresivitatea mediului lor de viață (anemii hemolitice extracorpusculare) (vezi tabelul 20.IV). Aceste condiții ostile pot apărea în plasmă (anticorpi antieritrocitari, medicamente, agenți patogeni), pot să aparțină sistemului vascular (vasculite, proteze diverse) sau pot însoți splenomegaliile importante. Pentru o orientare diagnostică rapidă între anemiile hemolitice corpusculare și cele extracorpusculare, date utile pot fi furnizate de examenul morfologic al sângelui. Tabelul 20.IV rezumă aspectele morfologice curente ce sugerează unele tipuri de anemii hemolitice. Alte semnificații posibile ale acelorași modificări morfologice eritrocitare au fost expuse într-o secțiune anterioară a acestui capitol.

Indicele distribuției eritrocitare (vezi „RDW" în tabelul 20.I) este un parametru determinat de mașinile electronice de efectuat hemograme (9). Distribuția eritrocitară se caracterizează prin 2 parametri statistici: media aritmetică a volumelor globulare (pe un eșantion de ~75 000 de celule măsurate fiecare în parte) și deviația standard față de această medie, care permite cunoașterea numerică a etalării distribuției eritrocitelor de o parte și de alta a axei curbei. Este de precizat că la normali repartiția volumelor se face conform legii lui Gauss, înregistrându-se sub forma

TABELUL 20.IV

Aspecte eritrocitare care orientează diagnosticul unor anemii hemolitice (AH)

AH corpusculare (endoeritrocitare)	AH extracorpusculare (extraeritrocitare)
Sferocite	
Sferocitoză ereditară Unele enzimopatii, după stresuri oxidante	Imune (allo- sau autoanticorpi) Medicamente (Aldomet) Septicemia cu *Clostridium welchii* Hipersplenism Arsuri severe Muşcături de păianjeni, albine, şerpi veninoşi Hipofosfatemie
Eliptocite (ovalocite)	
Eliptocitoza ereditară Talasemii	Carenţa de catalizatori (macroovalocite)
Poikilocite	
Forma neonatală cu picnocitoză a eliptocitozei ereditare Piropoikilocitoza ereditară	AH micro- şi macroangiopatice Coagulare intravasculară diseminată Purpura trombotică trombocitopenică Proteze valvulare Hemoglobinurie de marş
Eritrocite în semn de tras la ţintă	
Talasemii Hemoglobinoze S, C, D, E	
Drepanocite	
Siclemie (drepanocitoză)	
Stomatocite	
Stomatocitoză ereditară Eliptocitoza cu stomatocitoză	
Eritrocite cu punctaţii bazofile	
Talasemii Hemoglobinopatii cu hemoglobine instabile	Saturnism
Incluzii şi paraziţi	
	Malarie Bartoneloză

unei curbe simetrice față de axul vertical care coboară din vârful său. Indicele distribuției reprezintă raportul procentual dintre deviația standard (DS) și VEM.

$$\text{I.D.Er.} = \frac{\text{DS}}{\text{VEM}} \times 100 = 11{,}9\text{—}15{,}7\%$$

Un indice anormal traduce heterogenitatea volumelor eritrocitare (o anizocitoză) sau prezența unei duble populații. Variația I.D.Er. se face numai în sensul creșterii. O creștere izolată a I.D.Er. ar putea semnifica fie o anemie carențială la debut (feriprivă, prin catalizatori), fie un sindrom mielodisplazic la debut. O curbă bimodală dublată de creșterea I.D.Er. apare în faza de reparație a anemiilor carențiale (semnalează reticulocitoza). Compararea dintre I.D.Er. și VEM ajută la deosebirea anemiei feriprive (I.D.Er. ↑, VEM ↓) de talasemia heterozigotă necomplicată (I.D.Er.: normal, VEM ↓). În carența dublă (Fe+catalizatori) apare o despărțire importantă între valorile VEM (↓) și cele ale I.D.Er (↑), care se explică prin coexistența microcitelor hipocrome cu eritrocite cu diametre normale.

Examinarea măduvei osoase (MO) este obligatorie în următoarele situații deduse din analiza hemogramelor: 1) reacția leucoeritroblastică (sugestie pentru o invazie neoplazică a MO; 2) dispunerea eritrocitelor în rulouri (sugestie pentru gamapatie monoclonală); 3) reticulocitopenie cu pancitopenie (sugestie pentru aplazie, ineficiență de producție sau leucemie acută aleucemică); 4) hipocromia impune analiza fierului medular privind repartiția acestuia între sectorul de livrare și cel de utilizare și depistare a sideroblaștilor inelari; 5) prezența unui număr mic de mieloblești (inspecția MO permite diagnosticul diferențial dintre o leucemie acută subleucemică și o afecțiune mielodisplazică).

Anamneza și examenul fizic oferă date adiționale pentru încadrarea anemiei. De multe ori după executarea investigațiilor primare și a raționamentelor comentate în secțiunile precedente este necesară reluarea țintită a anamnezei și chiar și reexaminarea bolnavului.

Datele anamnezei țintite de interes major ar fi: vechimea anemiei după documente de laborator; profesia (cu accentuarea asupra unor factori de risc ocupaționali); obiceiurile alimentare; abuzul de alcool (eventual de droguri); coexistența unor boli cronice și tratamentul acestora; dacă au fost urmate (la sugestia altor medici sau din proprie inițiativă) tratamente prealabile antianemice empirice (preparate cu fier, B_{12} sau acid folic, sau „polivitamine de întărire", care conțin în general aceste trei substanțe); existența de pierderi de sânge (menstre abundente, sarcini, avorturi și alte pierderi genitale la femeie, sau sângerări digestive de diverse cauze la ambele sexe); existența unor tulburări digestive sugestive pentru malabsorbție; situația consanguinilor (anemie, dublată eventual de icter și/sau de crize biliare), mai ales dacă bolnavul însuși prezintă aceeași constelație de simptome care ar sugera un proces hemolitic; coexistența unor semne de glosită, esofagită sau de maldigestie, sugestive pentru o anemie carențială — în acest context mai general prezența friabilității capilare și ungheale împreună cu koilonikia ar sugera carența de fier, în timp ce asocierea parestezиilor ar sugera carența de

unei curbe simetrice față de axul vertical care coboară din vârful său. Indicele distribuției reprezintă raportul procentual dintre deviația standard (DS) și VEM.

$$\text{I.D.Er.} = \frac{\text{DS}}{\text{VEM}} \times 100 = 11{,}9\text{—}15{,}7\%$$

Un indice anormal traduce heterogenitatea volumelor eritrocitare (o anizocitoză) sau prezența unei duble populații. Variația I.D.Er. se face numai în sensul creșterii. O creștere izolată a I.D.Er. ar putea semnifica fie o anemie carențială la debut (feriprivă, prin catalizatori), fie un sindrom mielodisplazic la debut. O curbă bimodală dublată de creșterea I.D.Er. apare în faza de reparație a anemiilor carențiale (semnalează reticulocitoza). Compararea dintre I.D.Er. și VEM ajută la deosebirea anemiei feriprive (I.D.Er. ↑, VEM ↓) de talasemia heterozigotă necomplicată (I.D.Er.: normal, VEM ↓). În carența dublă (Fe+catalizatori) apare o despărțire importantă între valorile VEM (↓) și cele ale I.D.Er (↑), care se explică prin coexistența microcitelor hipocrome cu eritrocite cu diametre normale.

Examinarea măduvei osoase (MO) este obligatorie în următoarele situații deduse din analiza hemogramelor: 1) reacția leucoeritroblastică (sugestie pentru o invazie neoplazică a MO; 2) dispunerea eritrocitelor în rulouri (sugestie pentru gamapatie monoclonală); 3) reticulocitopenie cu pancitopenie (sugestie pentru aplazie, ineficiență de producție sau leucemie acută aleucemică); 4) hipocromia impune analiza fierului medular privind repartiția acestuia între sectorul de livrare și cel de utilizare și depistare a sideroblaștilor inelari; 5) prezența unui număr mic de mieloblaști (inspecția MO permite diagnosticul diferențial dintre o leucemie acută subleucemică și o afecțiune mielodisplazică).

Anamneza și examenul fizic oferă date adiționale pentru încadrarea anemiei. De multe ori după executarea investigațiilor primare și a raționamentelor comentate în secțiunile precedente este necesară reluarea țintită a anamnezei și chiar și reexaminarea bolnavului.

Datele anamnezei țintite de interes major ar fi: vechimea anemiei după documente de laborator; profesia (cu accentuarea asupra unor factori de risc ocupaționali); obiceiurile alimentare; abuzul de alcool (eventual de droguri); coexistența unor boli cronice și tratamentul acestora; dacă au fost urmate (la sugestia altor medici sau din proprie inițiativă) tratamente prealabile antianemice empirice (preparate cu fier, B_{12} sau acid folic, sau „polivitamine de întărire", care conțin în general aceste trei substanțe); existența de pierderi de sânge (menstre abundente, sarcini, avorturi și alte pierderi genitale la femeie, sau sângerări digestive de diverse cauze la ambele sexe); existența unor tulburări digestive sugestive pentru malabsorbție; situația consanguinilor (anemie, dublată eventual de icter și/sau de crize biliare), mai ales dacă bolnavul însuși prezintă aceeași constelație de simptome care ar sugera un proces hemolitic; coexistența unor semne de glosită, esofagită sau de maldigestie, sugestive pentru o anemie carențială — în acest context mai general prezența friabilității capilare și ungheale împreună cu koilonikia ar sugera carența de fier, în timp ce asocierea paresteziilor ar sugera carența de

vitamină B_{12}; existența tulburărilor micționale sau de diureză care ar putea revela o boală renală sau, în contextul asocierii unui subicter, modificarea culorii urinei în galben închis (hemoliză extravasculară?) sau în rubiniu (hemoliză intravasculară?). Se vor reține, de asemenea, vârsta, apartenența etnică și deplasările în străinătate, mai ales în zone în care predomină infestări endemice cu paraziți sau cu alți patogeni. Toate aceste date încearcă reconstituirea unor mecanisme ale anemiei: carență (fier sau catalizatori), hemoliză (ereditară sau dobândită), implicarea unor factori toxici sau a unor medicamente (tabelul 20.V).

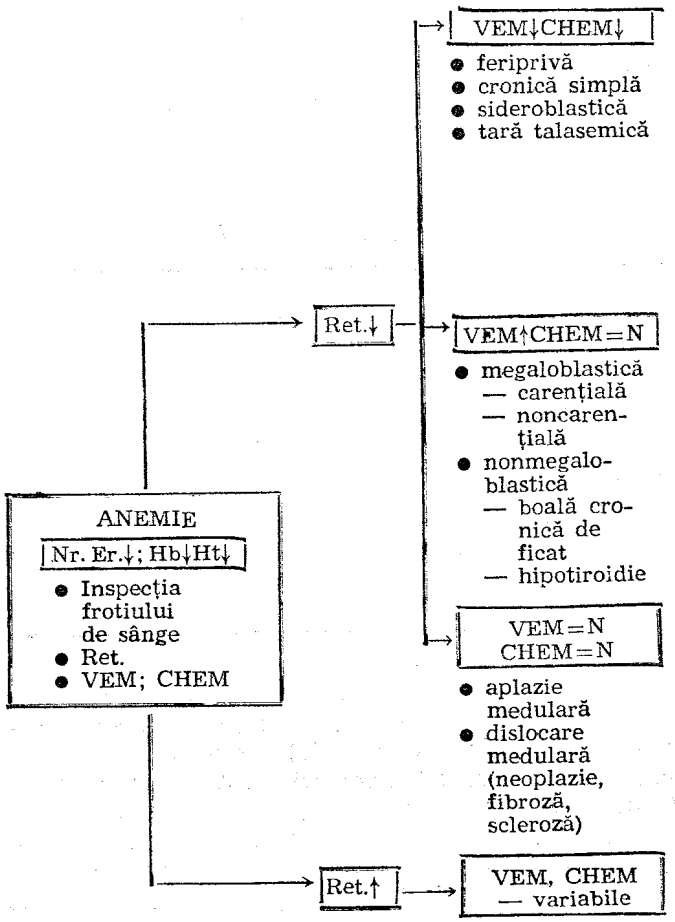
TABELUL 20.V

Categorii de medicamente (M) care pot genera anemie

1. M care pot provoca sângerări digestive oculte:
   aspirina, prednisonul, antiinflamatoare nesteroidice
2. M care pot diminua producția medulară:
   cloramfenicolul, citostaticele, fenitoina
3. M care pot produce megaloblastoză:
   trimetoprin, izoniazidă, methotrexate
4. M. care pot produce hemoliză:
   penicilină, cefalosporine, stibophen, sulfone, acid nalidixic, nitrofurantoină, primachină, acetanilidă, alfa-metil-dopa

La examenul fizic, pe lângă examinarea uzuală a organelor și sistemelor nu se vor neglija: aprecierea stării de nutriție, examinarea limbii (depapilarea este un semn de anemie carențială); examinarea buzelor și a mucoasei bucale (descoperirea unor telangiectazii poate indica o eventuală hemoragie din teritorii profunde invizibile); cercetarea atentă a existenței unei splenomegalii (se asociază eventual cu hipersplenism sau cu mai multe tipuri de anemie hemolitică — aceasta poate fi primară, sau secundară unor boli limfoproliferative dacă pe lângă mărirea splinei se constată și poliadenopatie și hepatomegalie); percuția oaselor superficiale (durerea la percuție apare în leucemii acute); căutarea semnelor de tromboză (vor putea revela un proces de coagulare intravasculară diseminată și în spatele acesteia o boală neoplazică ocultă).

Alte investigații specifice sunt necesare pentru confirmarea diagnosticului provizoriu care a fost stabilit după examenul clinic și investigațiile primare. O parte dintre ele sunt schițate în tabelul 20.VI, prezentarea lor detaliată urmând a fi făcută în capitolele respective.


Primele sugestii
Analize adiționale
ANEMIE
Nr. Er.↓; Hb↓Ht↓
• Inspecția frotiului de sânge
• Ret.
• VEM; CHEM
Ret.↓
Ret.↑
VEM↓CHEM↓
• feriprivă
• cronică simplă
• sideroblastică
• tară talasemică
1. Bilanțul fierului
— compartimentul circulant: sideremie, CTLF
— compartimentul de utilizare: feritinemia, hemosiderina medulară, sideroblaștii inelari
2. Electroforeza hemoglobinei
VEM↑CHEM=N
• megaloblastică
— carențială
— noncarențială
• nonmegaloblastică
— boală cronică de ficat
— hipotiroidie
1. Examenul măduvei osoase
2. Bilanțul catalizatorilor: cobalaminemia, folatemia+folatul eritrocitar
3. Testul Schilling, aciditatea gastrică după stimulare chimică
VEM=N
CHEM=N
• aplazie medulară
• dislocare medulară (neoplazie, fibroză, scleroză)
1. Puncție-biopsie medulară
2. Bilanțul fierului
3. Dozarea eritropoietinei circulante
4. Culturi medulare
5. Examen citogenetic
VEM, CHEM
— variabile
• hemolize
• sechestrare splenică
• stare post-hemoragie acută
1. Teste de hemoliză
2. Frotiul medular
3. Teste pentru hemolize imune: test Coombs, aglutinine la rece, hemolizine bifazice
4. Fragilitatea osmotică; autohemoliza
5. Testul Ham
6. Testul de siclizare
7. Electroforeza hemoglobinei

BIBLIOGRAFIE

1. HARMENING D. M.: Clinical hematology and fundamentals of hemostasis, ed. a II-a, Edit. F. A. Davis Comp., Philadelphia, 1992.
2. HILLMAN R. S., FINCH C. A.: Red Cell Manual, ed. a IV-a, Edit. F. A. Davis Comp., Philadelphia, 60.
3. KEITT A. S.: Introduction to the anemias. În Wyngaarden J. B., Smith L. H. Jr. (eds.): Cecil textbook of medicine, ed. a XVIII-a. Edit. Saunders Comp., Philadelphia, 1989, 878.
4. LEWIS S. M., VERWILGHEN R. L.: Dyserythropoiesis, Academic Press, Londra, 1977.
5. NICOLAU C. T., NICOARĂ ST.: Progrese în tehnicile hematologice uzuale, Edit. Medicală, București, 1966.
6. THORUP O. A. Jr.: Leavell and Thorup's Fundamentals of clinical hematology. Edit. Saunders Comp., Philadelphia, 1987, 166.
7. WAJCMAN H., LANTZ B., GIROT R.: Les maladies du globule rouge. Edit. Flammarion, Paris, 1992, 84.
8. WILLIAMS W. J., BEUTLER E., ERSLEV A. J., LICHTMAN M. A. (eds.): Hematology, ed. a IV-a. Edit. McGraw Hill Inc., New York, 1990, 307.
9. * * * L'histogramme différentiel. Résultats et interprétation, Monographie Coultronics, Margency, France, 41.

XXI

ANEMIILE HIPOCROME
(Anemii prin deficit în sinteza hemoglobinei)

N. MUNTEANU

Definiție. Generalități. Anemiile hipocrome alcătuiesc un grup mare de anemii, care au drept trăsătură comună patogenică deficitul cantitativ al sintezei de hemoglobină, ceea ce duce la scăderea concentrației medii de hemoglobină pe eritrocit (sub $32 \pm 2\%$), situație ce caracterizează morfologic *hipocromia*. Eritrocitele din acest grup de anemii au totodată și un volum redus (VEM $< 90 \mu^3$/fml) ceea ce definește *microcitoza*. Așadar, caracterele morfologice ale acestor anemii sunt hipocromia și *microcitoza*.

Există desigur și abateri moderate de la aceste trăsături: uneori volumul eritrocitar poate fi normal, dar cu o concentrație de hemoglobină subnormală, iar alteori când gradul de anemie este moderat, atât microcitoza, cât și hipocromia nu sunt exprimate (127).

Microcitoza și hipocromia. În anemia hipocromă microcitară sunt reduse: volumul eritrocitar mediu, concentrația medie de hemoglobină pe eritrocit și cantitatea de hemoglobină din eritrocit (95). Aceste anomalii determină deseori o discrepanță între numărul de eritrocite (ceva mai crescut) și cantitatea de hemoglobină, mult mai redusă (95).

În practică, detectarea microcitozei și hipocromiei se face prin efectuarea indicilor eritrocitari (tabelul 21.I) și cel mai rapid și practic prin examinarea frotiului de sânge periferic, deoarece indicii eritrocitari sunt valori medii, izolate și nu pot exprima ceea ce se întâmplă în populația eritrocitelor (127, 128). Astfel, ei nu pot decela o populație numeric redusă de eritrocite microcitare și hipocrome sau o dublă populație eritrocitară, una cu volum și încărcare cu hemoglobină normale și alta care este microcitară, hipocromă.

Examinarea frotiului de sânge periferic se face pe preparate întinse într-un strat subțire și cu o colorație adecvată. Hipocromia apare ca o *creștere a palorii centrale* care, în situația când este mult extinsă, con-

feră eritrocitelor un aspect de „anulocite". Un alt semn de hipocromie este reprezentat de *„eritrocitele în semn de tras la țintă"* (planșa VI-a).

Microcitoza apare pe frotiu ca o reducere a diametrului eritrocitelor. În talasemia minoră, dată fiind reducerea grosimii eritrocitelor (leptocitoză), diametrul lor pare normal; hipocromia lor este însă evidentă, iar indicii eritrocitari arată o reducere a volumului mediu și o reducere moderată a concentrației de Hb (37).

TABELUL 21.I

Indicii eritrocitari normali

Volumul eritrocitar mediu (VEM) $= \frac{\text{Hematocrit (L)} \times 1\,000}{\text{Nr. eritrocite } (\times 10^{12}/\text{L})^*}$

Valori medii=90 μ^3 sau 90 fl/l femtolitru=10^{-15} L

Cantitatea de hemoglobină eritrocitară medie **CHM** $= \frac{\text{Hemoglobina g/L}}{\text{Nr. eritrocite } (\times 10^{12}/\text{L})}$

Valori medii=29 micromicrograme ($\mu\mu$g)/e sau 29 picograme (pg)/e
1 picogram=10^{-12} grame

Concentrația medie de hemoglobină din eritrocit **(CHEM)** $= \frac{\text{Hemoglobina g/dl}}{\text{Hematocrit (L)}}$

Valori medii 32±2% sau 33 g/dl de eritrocite

* Exprimarea actuală după normele Comitetului Internațional de standardizare în hematologie (femtolitru, picograme etc.) corespund măsurilor anterioare exprimate în microni, micromicrograme etc. De asemenea, exprimarea hematocritului și a cifrei de elemente figurate ale sângelui se face la „litru"; iar cea a hemoglobinei la *dl* sau la litru de sânge.

Exemplu:
Ht=0,451/litru=45 ml/100 ml= 45%
Hb=15 g/dl=15 g/100 ml
Lc=5×10^9/l=5 000/mm^3
A se vedea tabelul de valori normale

Examinarea frotiului de sânge periferic este utilă și în anemiile sideroblastice, deoarece poate descoperi existența a 2 populații de eritrocite: una microcitară și hipocromă și alta macrocitară. Acest aspect este numit *„dimorfism eritrocitar"* (98). În această situație indicii eritrocitari pot fi normali (127).

În anemia cronică simplă din unele boli cronice, examinarea frotiului este de asemenea sugestivă, deoarece populația de eritrocite hipocrome și microcitare variază procentual în diferite afecțiuni cronice de bază (a se vedea capitolul „Anemia din boli cronice") (38).

De asemenea și în această categorie de boli, indicii eritrocitari pot avea valori normale ale volumului eritrocitar, cu sau fără reducerea concentrației de hemoglobină (38, 43, 71).

Pe lângă aceste informații esențiale pentru prima etapă de diagnostic a hipocromiei și a microcitozei, examinarea frotiului de sânge periferic este deosebit de valoroasă prin informațiile suplimentare: anizocitoza și schizocitoza eritrocitară sunt mai frecvente și caracteristice în talasemie,

la care se adaugă policromatofilia în talasemia majoră, ca și prezența de punctații bazofile în eritrocite; acestea sunt caracteristice pentru talasemie și anemiile sideroblastice (98, 127). Aceste date vor fi discutate în capitolul dedicat investigațiilor în anemiile hipocrome.

Pe lângă examinarea frotiului de sânge periferic și evaluarea indicilor eritrocitari, examinarea curbei distribuției volumelor eritrocitare (Price-Jones) aduce un plus de informație în diagnostic. Tehnologia actuală automată permite executarea rapidă, corectă, atât a indicilor eritrocitari cât și a curbei de distribuție a volumelor eritrocitare astfel că prima etapă de diagnostic este mult ușurată (13, 37).

ETIOLOGIE, PATOGENIE ȘI CLASIFICARE

Se știe că sinteza normală de hemoglobină are loc în citoplasma eritroblaștilor din măduva osoasă și impune sinteza sincronă a hemului, din protoporfirină și fier, în mitocondrie, ca și a globinei (proteina specifică) în reticulul endoplasmatic (ribosomi). O tulburare în sinteza hemoglobinei provine astfel din afectarea celor 3 componente menționate: metabolismul fierului, sinteza protoporfirinei și sinteza globinei. Ele sunt expuse în fig. XXI.1 și vor fi discutate separat.

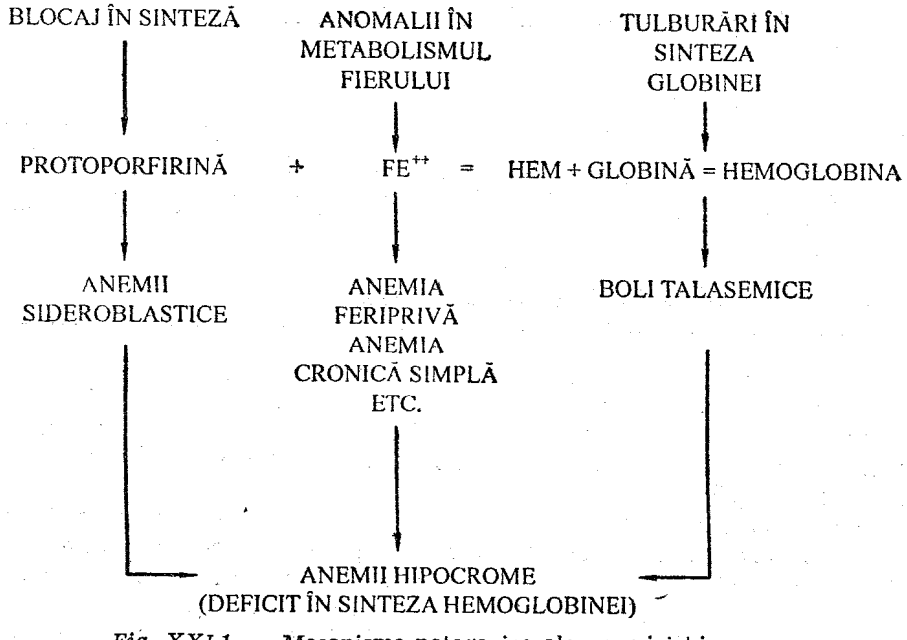


Fig. XXI.1. — Mecanisme patogenice ale anemiei hipocrome.

Tulburările metabolismului fierului pot fi mai bine înțelese dacă se cunosc compartimentele fiziologice ale acestuia (a se vedea capitolul metabolismul fierului).

În primul rând este util a se menționa cele 2 situații anormale posibile ale metabolismului fierului în anemiile hipocrome: a) *scăderea can-*

tității totale a fierului din organism, situație ce caracterizează *„deficitul de fier“* și b) *repartiția anormală* a fierului în organism. În ambele cazuri scade *„aportul de fier“* către măduva osoasă, iar eritropoieza suferă prin lipsa fierului, rezultatul fiind eritrocitele microcitare și hipocrome.

În *„deficitul de fier“*, procesul începe inițial prin depleția depozitelor, care ajunge în situația finală de a nu mai oferi plasmei fierul necesar eritropoiezei normale (88, 127). O scădere, de exemplu, sub 16% a saturației în fier a transferinei nu mai poate oferi eritropoiezei cantitatea necesară de fier, în pofida unui „turnover“ crescut al fierului plasmatic. Rata de producție a eritrocitelor scade și ele devin concomitent microcitare și hipocrome.

„Repartiția anormală a fierului“ în organism cuprinde compartimentul circulant, cel al utilizării fierului la nivelul eritroblaștilor din măduva osoasă, ca și depozitele de fier.

Compartimentul fierului circulant este alcătuit din transferina legată de fier (Fe^{+++}). Transferina este o proteină specifică, sintetizată în macrofage și poate fi redusă ca urmare a unor tulburări genetice, ca în „atransferinemia congenitală“ sau „dobândită“, ca în unele boli, cum este nefroza (v. cap. Atransferinemii) (12, 49, 53). Aportul de fier la eritroblaști este extrem de mult redus, anemia este microcitară hipocromă, fără hemosiderină în macrofagele măduvei osoase, dar cu depunere excesivă de fier în macrofagele ficatului, ajungându-se chiar la un tablou clinic de hemocromatoză (12, 49, 53, 60).

Concentrația fierului seric este extrem de redusă, dată fiind absența suportului transportor, capacitatea de fixare a fierului este evident scăzută din cauza reducerii cantității de transferină circulantă (12, 53).

O altă anomalie în compartimentul de transport al fierului este *„deficitul de cupru“* (67, 101). Cuprul este transportat de o alfa-2-globulină, *ceruloplasmina*, care atunci când este legată de cupru are o activitate de feroxidază și ca atare menține fierul în stare trivalentă legat de transferină (41, 57, 67, 101).

În deficitul de cupru, ce poate apărea la copii malnutriți și la adultul hrănit artificial, transportul fierului la măduvă este deficitar și rezultă o anemie microcitară, hipocromă cu depunere de fier în macrofagele hepatice (41); anemia răspunde la tratamentul cu preparate de cupru (vezi cap. Atransferinemii) (67, 101).

Compartimentul utilizării fierului în măduva osoasă este rar afectat. O tulburare genetică care face ca receptorii pentru transferină de pe eritroblaști să se reducă numeric este la baza „sindromului Shahidi-Nathan-Diamond“ (127, 128).

Activitatea receptorilor eritroblastici poate fi afectată și de un mecanism autoimun, și anume blocarea acestora de un autoanticorp de tip IgG (antireceptor). Rezultatul este tot o anemie hipocromă, microcitară cu depunere importantă de fier în macrofagele din măduva osoasă și splină (73).

Compartimentul depozitelor de fier este frecvent afectat într-o multitudine de boli cronice infecțioase, inflamatorii (boli de colagen), precum și în neoplazii (vezi cap. Anemia din bolile cronice). În aceste stări fierul este blocat în macrofagele din ficat, splină și măduva osoasă (38, 59). Eliberarea fierului din aceste depozite este mult redusă, motiv pen-

tru care aportul de fier la eritroblaștii medulari este mult redus (38, 59, 87).

Anemia ce rezultă este hipocromă, uneori hipocromia este parțială, volumul eritrocitar este moderat redus sau normal (71). Concentrația fierului seric este redusă, niciodată însă saturarea transferinei nu scade sub 16% ca în anemia feriprivă, în schimb capacitatea de fixare a fierului este moderat scăzută (87).

O privire de ansamblu asupra tulburărilor metabolismului fierului arată că anemiile hipocrome microcitare ce rezultă din aceste tulburări, se pot divide în două mari grupe: anemii prin deficit de fier, caracterizate prin *scăderea cantității totale de fier din organism* și anemii în care *cantitatea de fier* din organism este *normală sau crescută* însă *anormal distribuită* (98).

Tulburări în sinteza protoporfirinei. Sinteza protoporfirinei poate fi redusă prin blocarea unor enzime, la diferite niveluri (delta-aminolevulin sintetaza, coproporfirinogen oxidaza, hemisintetaza etc.). Deficitul sintezei protoporfirinei sau blocarea legării sale cu fierul bivalent la nivelul mitocondrinei, lasă fierul nefolosit și acesta se depune sub formă de micelii feruginoase în mitocondrii (98, 127, 128).

Sideroblaștii ce rezultă din acest proces anormal sunt denumiți *inelari* și sunt considerați patologici. Se știe că sideroblaștii normali conțin granule de feritină în citoplasmă (33).

Anemiile ce rezultă prin blocarea sintezei protoporfirinei sunt denumite *sideroblastice,* sunt microcitare și hipocrome în formele ereditare și au caracter *dimorf* în cele dobândite. Eritrocitele au frecvent punctații bazofile. Fierul seric este crescut, iar capacitatea totală de fixare a fierului este scăzută. Există o cantitate mare de fier în macrofagele măduvei osoase, ficatului și splinei, cu o vădită tendință la hemocromatoză (vezi cap. Anemii sideroblastice) (98, 127, 128).

Tulburări în sinteza globinei. În acest grup sunt incluse bolile talasemice, în care sinteza unuia din lanțurile normale de polipeptide ale globinei este deficitară. În forma heterozigotă, deficitul de sinteză a globinei dă naștere unei anemii hipocrome, microcitare chiar dacă cifra de Hb/dl este moderat redusă (127, 128).

În forma homozigotă (majoră), anemia este severă și microcitoza și hipocromia sunt pronunțate. De asemenea în hemoglobinopatia H (boală), hipocromia și microcitoza sunt severe.

În talasemie, hipocromia este severă, deoarece este legată în primul rând de sinteza defectuoasă a unui lanț ca, de exemplu, lanțul beta în β-talasemie; în același timp sinteza normală a celuilalt lanț, alfa, face ca o cantitate destul de importantă a acestuia să rămână în exces, să precipite intracelular fiind slab solubil și să formeze corpi Heinz. Aceștia sunt epurați de filtrul splenic de unde rezultă un deficit și mai mare în concentrația de Hb eritrocitară (128).

În hemoglobinopatiile C și E, sinteza hemoglobinei este calitativ anormală ceea ce face ca microcitoza și hipocromia eritrocitare să fie moderate (13, 89). Dacă în aceste boli apare totuși o hipocromie marcată, se poate suspecta asocierea cu alfa-talasemia.

În boala cu hemoglobine instabile poate apărea de asemenea o anemie hipocromă marcată, deoarece acestea precipită intracelular și pierd

hemul, iar corpii Heinz induși prin această precipitare a Hb, sunt curățați de filtrul splenic.

Clasificarea anemiilor hipocrome apare simplă după expunerea de mai sus. Ea are un criteriu unic, și anume cel etiopatogenetic care este cel mai practic în diagnosticul acestor boli. Clasificarea este expusă în tabelul 21.II.

TABELUL 21.II

Clasificarea anemiilor hipocrome

A. **Tulburări în sinteza hemului**

I. *Afectarea metabolismului fierului*

1. Scăderea cantității totale de fier din organism (carența de fier): anemia feriprivă
2. Repartiția anormală a fierului în organism
   a) Blocarea fierului în macrofage:
      — anemia din bolile cronice
      — anemia din hemosideroza pulmonară
   b) Anomalie în transportul fierului: atransferinemia congenitală sau dobândită
   c) Blocarea receptorilor de fier ai eritroblaștilor: anemia Shahidi-Diamond (congenitală sau prin mecanism imun)

II. *Tulburarea sintezei protoporfirinei**

1. Anemii sideroblastice ereditare
2. Anemia sideroblastică dobândită
3. Anemii sideroblastice secundare

B. **Tulburări în sinteza globinei****

I. Talasemia și bolile talasemice

II. HbC, HbE etc.

* A se vedea „Sinteza protoporfirinei și anemiile sideroblastice".
** A se vedea cap. „Hemoglobinele și talasemii și boli talasemice".

INVESTIGAȚII UZUALE DE LABORATOR ÎN ANEMIILE HIPOCROME

Examenul morfologic al sângelui periferic. Studiul frotiului de sânge periferic este momentul inițial de la care se pornește investigația unei anemii în general și a celei hipocrome în particular (127).

După ce morfologii au observat anomaliile eritrocitare în anemii, s-au calculat indicii eritrocitari care au adus informații certe asupra volumului mediu eritrocitar, concentrația și cantitatea de hemoglobină din eritrocit etc. În acest mod criteriul morfologic de clasificare a anemiilor s-a impus și a rămas până în prezent cel mai utilizat în clinică (127, 128).

S-au efectuat numeroase studii de morfologie eritrocitară în domeniul anemiilor hipocrome deoarece s-a încercat ca, utiiizând examenul frotiului de sânge periferic și indicii eritrocitari, să se stabilească unele criterii

de diferențiere între anemia feriprivă și celelalte anemii hipocrome, cum sunt anemia din bolile cronice, talasemiile anemiile sideroblastice etc. (13, 37, 43, 89, 95).

Astfel, în anemia feriprivă, hipocromia și microcitoza ca de altfel și anizopoichilocitoza sunt mult mai pronunțate decât în anemia din bolile cronice (38, 43, 71).

Dificultăți de diferențiere între ele apar în formele de anemie feriprivă moderată când hipocromia nu este exprimată (71).

Talasemia se poate identifica mai ușor, deoarece volumul eritrocitar apare mult mai mic în raport cu hipocromia ca și cu gradul anemiei (13, 43, 89).

În talasemie, eritrocitele conțin punctații bazofile, anizocitoza este mai marcată decât în anemia feriprivă și apare o schizocitoză importantă (89). O schizocitoză evidentă poate fi întâlnită și în anemia feriprivă de durată lungă, deoarece eritrocitele hipocrome au o rezistență mecanică redusă (98, 127).

Unii cercetători au imaginat anumite procedee de diferențiere între deficitul de fier și talasemie (43, 89).

S-a propus, de exemplu, o formulă rar întrebuințată în practică, un factor discriminant (FD):

FD=VEM—E—(5×Hb)—3,4 (în care E=primele 2 cifre ale numărului de eritrocite, iar 3,4 un coeficient). În deficitul de fier se obțin valori pozitive, iar în talasemie valori negative (valori confidente se întâlnesc însă doar în 70% din cazuri).

Curba de distribuție a volumelor eritrocitare (Price-Jones) a fost de asemenea folosită în diferențierea celor două boli (13, 47, 117). Coeficientul de variație normal este sub 14%. În anemia feriprivă el este peste 14%, iar în talasemie este mult sub 14%. Desigur trebuie înregistrate și modificările caracteristice ale talasemiei pe frotiu: anizocitoza, schizocitoza, punctațiile bazofile, policromatofilia, celule în semn de tras la țintă etc. Hemoglobinopatiile H, E, homozigote sunt normocitare, hipocrome, cu prezența de celule în semn de tras la țintă (13, 37, 89, 106).

Anemiile sideroblastice au ca trăsătură caracteristică pe frotiu *dimorfismul eritrocitar* la care se adaugă punctațiile bazofile. În forma ereditară există o microcitoză cu hipocromie și anizopoikilocitoză (21, 52). În forma dobândită dimorfismul este mai bine exprimat, eritrocitele sunt normocitare, hipocromia mai puțin evidentă, punctații bazofile prezente (98, 127).

Modificările frotiului de sânge periferic în anemiile hipocrome sunt expuse sinoptic în tabelul 21.III.

Investigarea metabolismului fierului este obligatorie în anemiile hipocrome. Odată stabilit în laborator diagnosticul de anemie hipocromă apare imediat obligativitatea de a preciza dacă *sinteza hemoglobinei a avut loc în prezența sau în absența fierului.*

Precizarea este necesară și din motive terapeutice: dacă în cauză este un deficit de fier, se administrează terapia marțială, iar dacă se constată că există o cantitate importantă de fier în organism, terapia marțială este lipsită de sens și dăunătoare.

Investigarea metabolismului fierului se începe cu determinarea fierului seric și a capacității totale de fixare a fierului (117). Unele măsuri,

pentru ca această determinare să fie corectă, trebuie respectate: bolnavul trebuie să țină post (sau un regim adecvat fără substanțe ce conțin fier) 12 ore, nu trebuie să fi luat preparate cu fier cel puțin 3—4 zile, recoltarea se face dimineața în sticlărie fără urme de fier și cu ace noi și seringă de masă plastică. Valorile normale ale fierului circulant sunt ~70 μg/100 ml (femei) și 100 μg (bărbați). Coeficientul de saturare cu

TABELUL 21.III

Modificări ale frotiului de sânge periferic în anemiile hipocrome corelate cu indicii eritrocitari

Tipul de anemie (în raport cu datele normale)	Anizocitoză Poikilocitoză	Punctații bazofile	Celule „în țintă"	Dimorfism	VEM fl.	Concentrația eritrocitară medie de Hb (g/dl)
Normal	±	0	0	0	89 (83—96)	34 (32—36)
Anemia feriprivă	1— 3+	0	±	0	74 (53—93)	28 (22—31)
Anemia din bolile cronice	±	0	±	0	86 (70—95)	32 (26—36)
Talasemia						
— minoră	1+	2+	1+	0	68 (56—75)	31 (29—33)
— majoră	3+	3+	3+	0	(48—72)	(23—32)
— Hb-H	2+	±	3+	0	70 (53—88)	25 (24—28)
Hemoglobinopatii						
— C	2+	±	50% (10—90%)	0	74 (55—93)	32 (23—34)
— E	2+	±	50% (10—90%)	0	69 (66—72)	32 (29—34)
Anemii sideroblastice						
— ereditare	3+	2+	2+	2+	77 (49—104)	25 (14—30)
— dobândite	1+	2+	±	3+	104 (83—118)	32 (26—37)

fier a transferinei este de 30%. Acest coeficient este sub 16% în anemia feriprivă și ceva mai ridicat, dar sub 20% în anemia din bolile cronice (117). Un coeficient sub 5% indică cert o anemie feriprivă. În talasemii saturația este de peste 30%, iar în anemiile sideroblastice este de 90—100%. Capacitatea totală de saturare în fier a transferinei este revelatoare: este mult crescută (peste 300 μg/100 ml) în anemia feriprivă și sarcină, este sub normală în anemia din bolile cronice și talasemii și cu netă tendință la scădere în anemiile sideroblastice, ca și în hemocromatoză (117, 127, 128).

Aprecierea depozitelor de fier este a doua investigație obligatorie în toate anemiile hipocrome (15).

Cea mai simplă metodă este determinarea hemosiderinei medulare cu condiția ca la aspirația măduvei osoase să se obțină fragmente (grunji).

Pe frotiurile necolorate granulele de hemosiderină apar în sideroblaști galben aurii, în situația unor depozite de fier crescute. Cel mai

corect procedeu este colorația cu albastru de Prusia, care colorează hemosiderina medulară în granule albastre (98, 127, 128).

Aprecierea la microscopul optic este evaluabilă cu o gradație de la 0 la +6, în funcție de prezența și frecvența pe câmpurile cercetate a macrofagelor ce conțin fier (127).

Măduva normală este evaluată între 1+ și 3+.

În anemia feriprivă, hemosiderina medulară este de obicei absentă. În anemia din boli cronice este între 4+ și 5+, în talasemia minoră și în hemoglobinopatiile homozigote este între 2+ și 4+.

Valori crescute 5+—6+ se întâlnesc în talasemia majoră și anemiile sideroblastice.

Biopsia hepatică este mai rar folosită în practica hematologică cu excepția hemocromatozei. Se gradează 0—4+.

Cea mai utilizată metodă, cu rezultate excelente în aprecierea depozitelor de fier ale organismului uman, este dozarea feritinei circulante (serice) prin metoda RIA (15, 26, 56, 121). Concentrațiile medii normale de feritină serică sunt 69 μg/l pentru bărbați și 35 μg/l pentru femei (121).

Deficitul de fier este cert la valori de feritină serică sub 10 μg/l. În hemocromatoză valori peste 1 000 μg/l sunt frecvente. În anemia din boli cronice valorile sunt în jurul celor normale sau crescute (15, 26, 56, 121).

În anemia megaloblastică Biermer, valorile sunt de asemenea crescute.

O situație specială o au bolile acute sau cronice ale ficatului în care valorile feritinei serice sunt mai mari decât valorile medii. Există, în general, o corespondență între valorile oferite de hemosiderina medulară și cele date de feritina serică (76, 121).

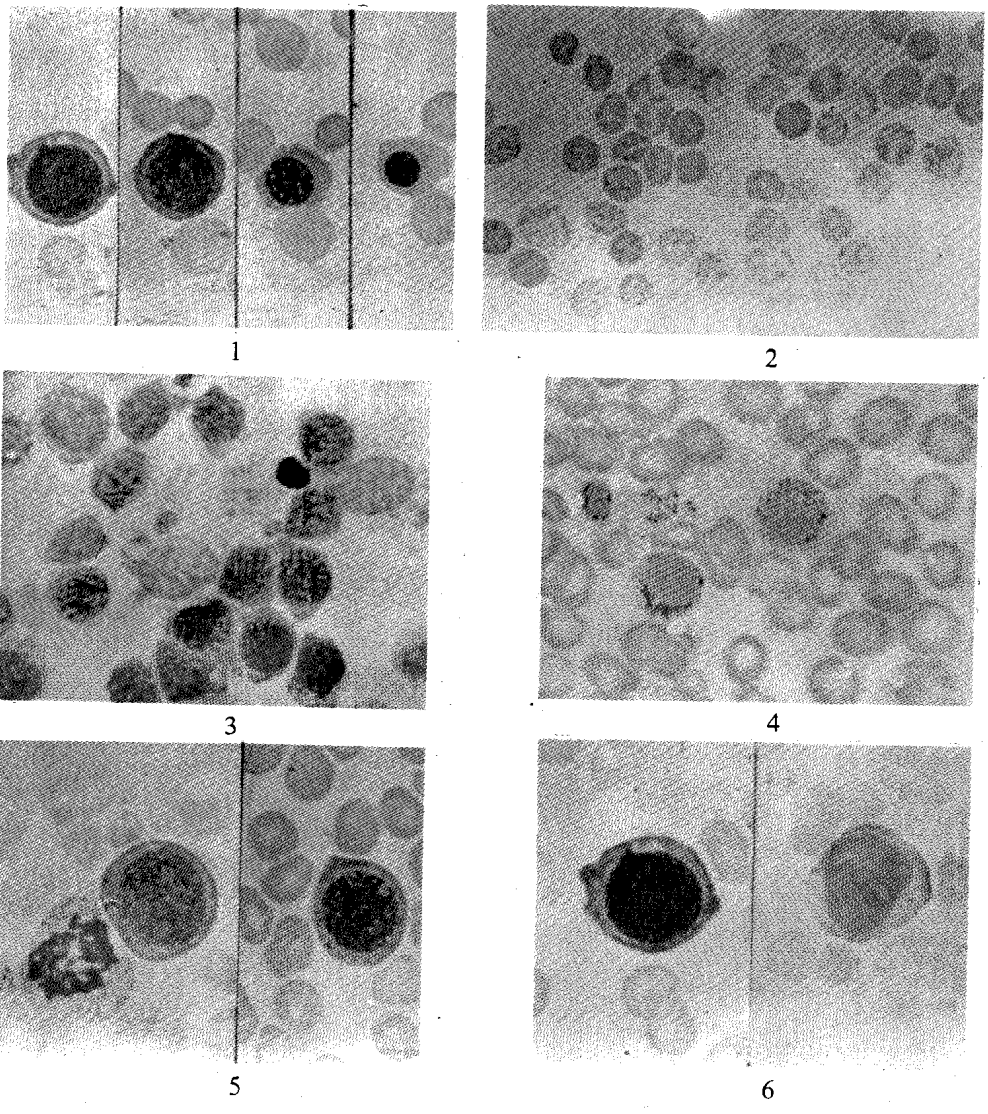
Depozitele de fier se mai apreciază și prin testul de absorbție intestinală a fierului, care se execută fie prin administrarea peroral a unei cantități de preparate de fier obișnuite, fie prin administrarea unei soluții ce conține fier radioactiv (32).

Prima metodă, denumită „istorică", cercetează curbele de fier seric după absorbție, iar cea de-a doua măsoară cantitatea de fier radioactiv în fecale sau retenția de fier radioactiv în organism cu ajutorul scintigrafiei (32). O creștere importantă a absorbției de fier prin intestin este semnificativă pentru depleția depozitelor de fier și invers. (O mențiune este necesară, și anume că în hemocromatoza idiopatică absorbția intestinală a fierului nu este redusă, ci crescută.)

O altă metodă, mai puțin utilizată, este testul de eliminare urinară a fierului prin administrarea de agenți chelanți (19). Agentul cel mai des utilizat este desferoxiamina în cantitate de 500 mg i.m. după care se măsoară excreția urinară de fier în 24 de ore (15, 121).

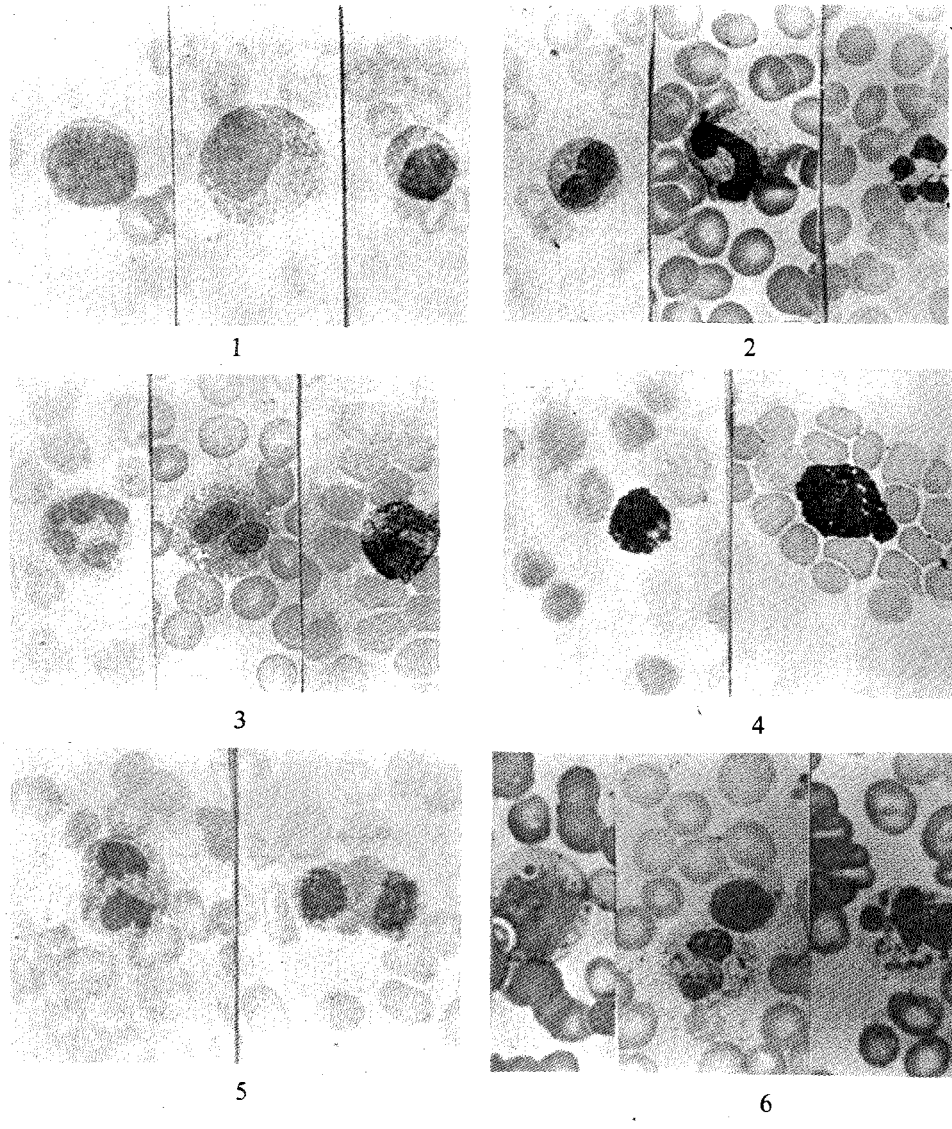
Corelația testului cu magnitudinea depozitelor de fier este însă mai puțin sensibilă (15, 19).

Excreția normală de fier este de 0,1—3,6 mg/24 de ore cu o medie de 0,7 mg. În deficitul de fier media este de 0,1 mg (0—1,7 mg), iar în anemiile sideroblastice este de 7,8—15,5 mg. Testul are utilitate în supraîncărcarea cu fier și în urmărirea terapiei cu substanțe chelante de fier în hemocromatoze (15).



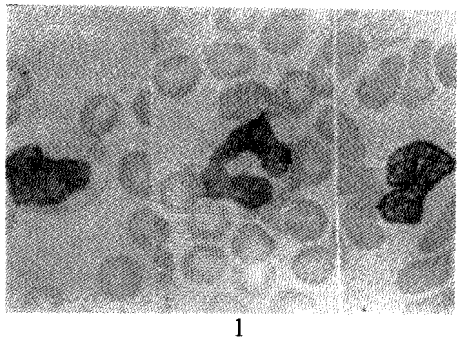
Planşa I. – CELULE DIN SERIA ERITROCITARĂ

1. – proeritroblast, eritroblast bazofil, eritroblast policromatofil, eritroblast oxifil (de la stânga la dreapta); 2. – reticulocite; 3. – macrofag central înconjurat cu eritroblaşti (insulă eritroblastică); 4. – siderocit (central) înconjurat de trei sideroblaşti inelari; 5. – mitoză în metafază şi proeritroblast (în stânga); proeritroblast (în dreapta); 6. – proeritroblast (în stânga) mieloblast (în dreapta).

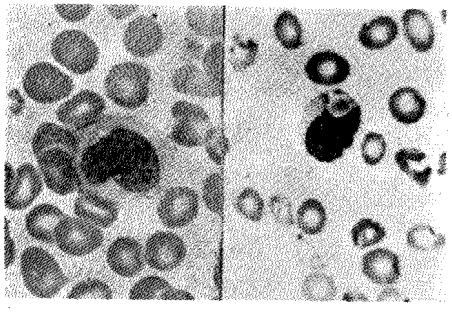


Planşa a II-a. – CELULE DIN SERIA GRANULOCITARĂ

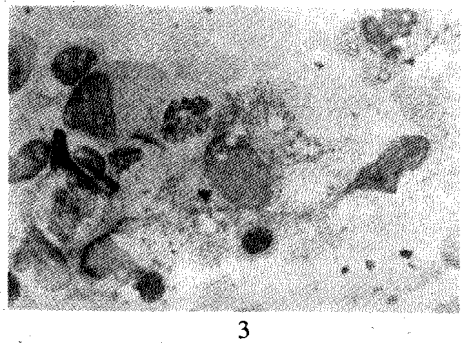
1. – mieloblast (în stânga); promielocit (în mijloc); mielocit neutrofil (în dreapta); 2. – metamielocit neutrofil (în stânga); nesegmentat neutrofil (în mijloc); segmentat neutrofil (în dreapta); 3. – segmentat neutrofil (în stânga); segmentat eozinofil (în mijloc); segmentat bazofil (în dreapta); 4. – segmentat bazofil (în stânga); mastocit (în dreapta); 5. – mitoze în metafază (în stânga în citoplasmă granulații azurofile); 6. – anomalia Chediak: promielocit cu granulații mari, azurofile în centrul unor vacuole (în stânga); un limfocit cu o granulație mare azurofilă şi un nesegmentat cu granulații mari (în mijloc); un granulocit cu granulații mari (în dreapta).



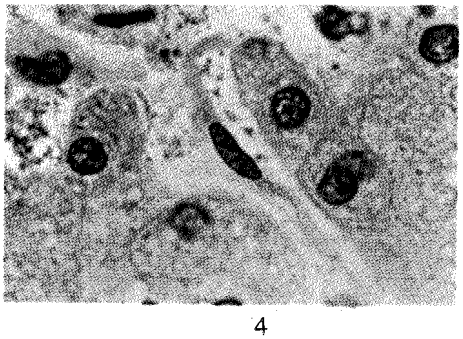
1



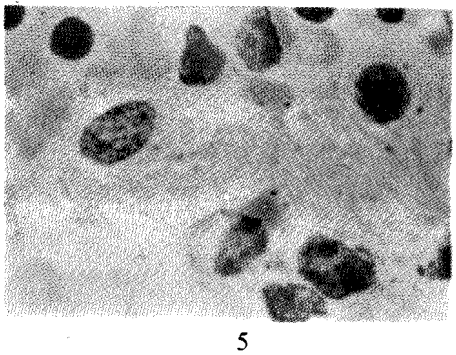
2



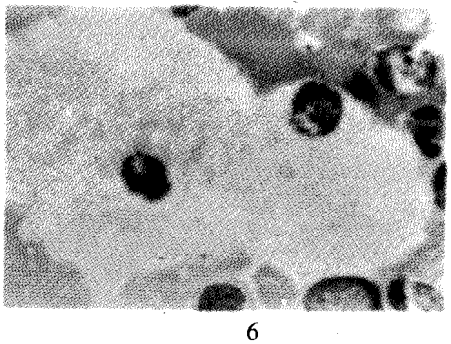
3



4



5



6

Planşa a III-a. – CELULE DIN SERIA MONOCITO-MACROFAGICĂ

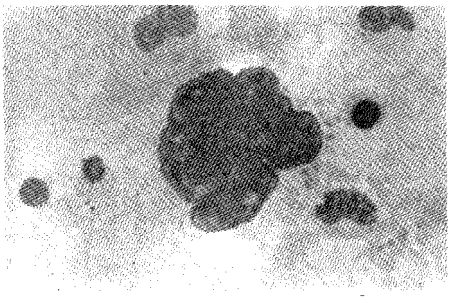
1. – monocite (în stânga şi la mijloc); nucleu de monocit (în dreapta); 2. – monocit (în stânga); monocit cu vacuolă fagocitară (în dreapta); 3. – macrofag în măduvă; 4. – celulă Kupffer („macrofag fix") în centru, iar în jur celule hepatice secțiuni de ficat; colorație hematoxilină-eozină; 5. – două celule Gaucher (frotiu de măduvă); 6. – două celule Niemann-Pick (frotiu de măduvă).

1

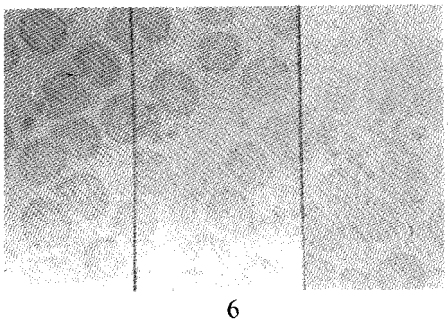
2

3

4



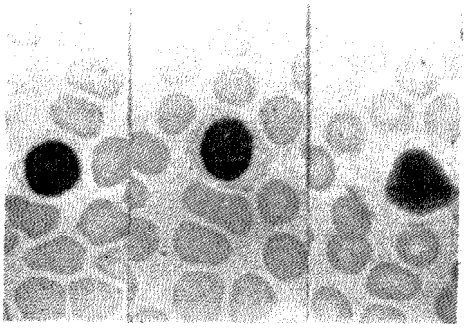
5



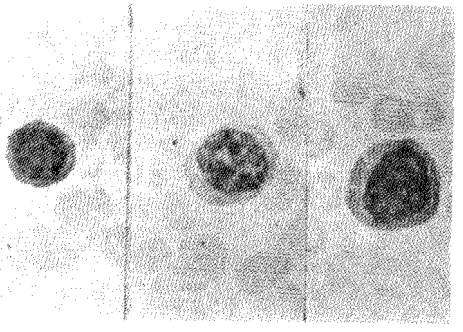
6

Planşa a IV-a – CELULE DIN SERIA MEGACARIOCITO-TROMBOCITARĂ

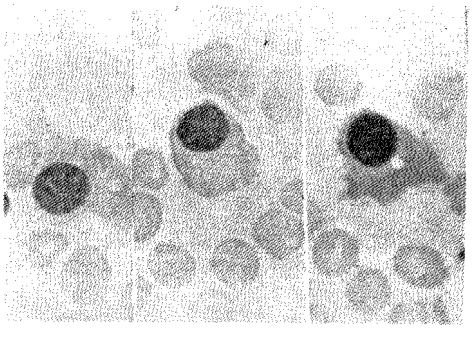
1. – Megacarioblast; 2. – Promegacariocit; 3. – Megacariocit granulat; 4. – Megacariocit trombocitogen; 5. – Nucleu liber de megacariocit; trombocite în jur; 6. – Trombocite agregate în grămezi mici (în stânga), mijlocii (în mijloc) şi mari (în dreapta).



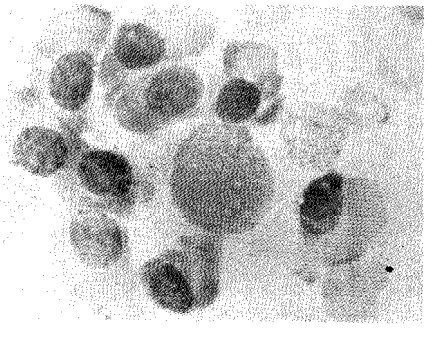
1



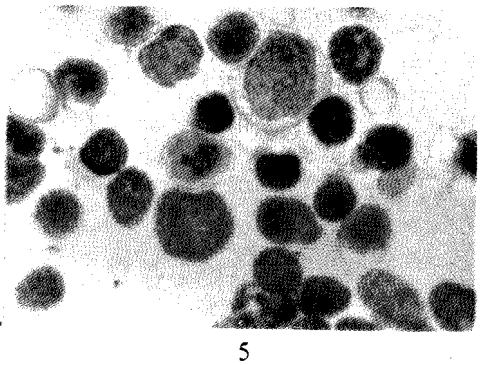
2



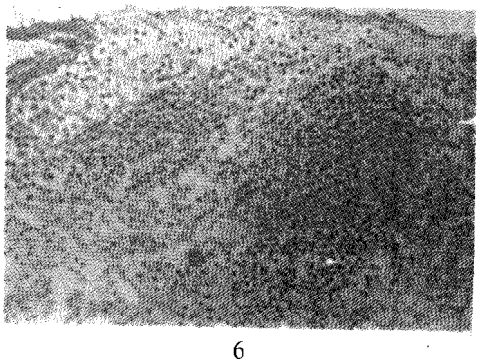
3



4



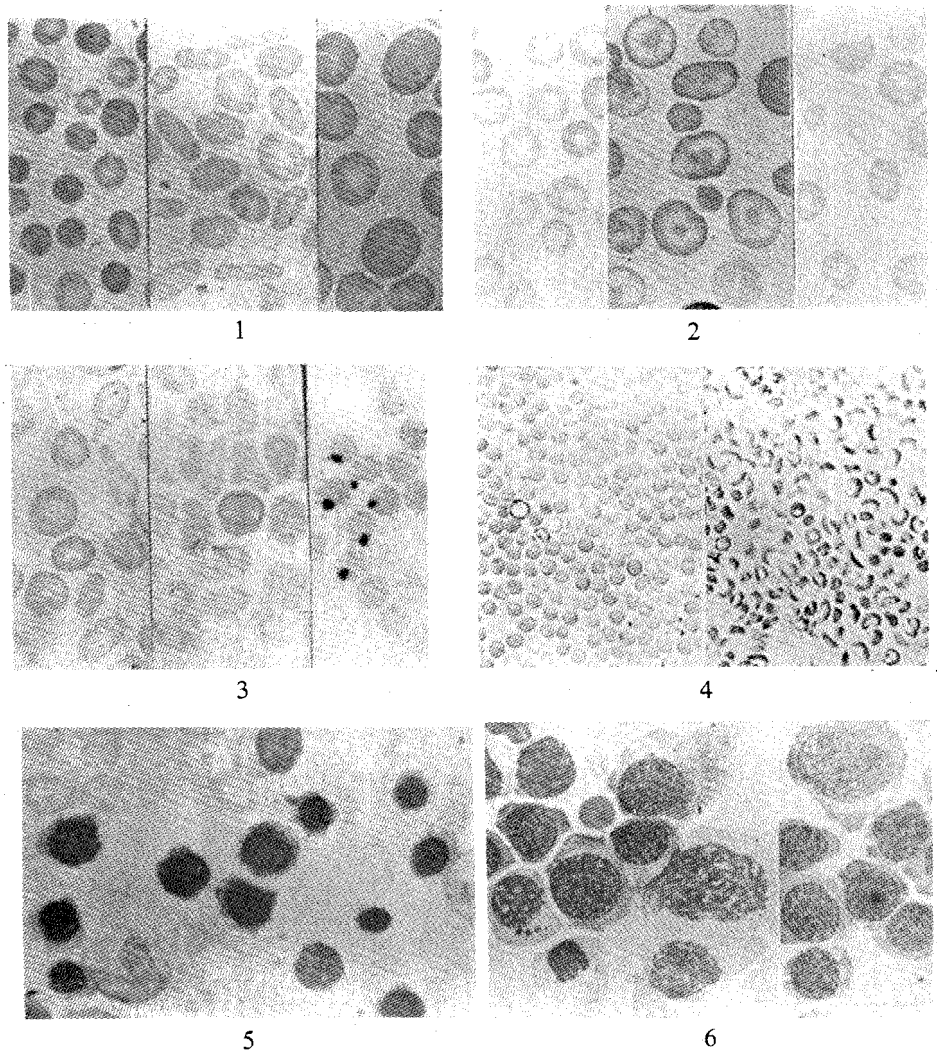
5



6

Planşa a V-a – CELULE DIN SERIA LIMFO-PLASMOCITARĂ

1. – Limfocit mic (în stânga); limfocit mijlociu (în mijloc); limfocit mare (în dreapta); 2. – Celule Türck (limfoplasmocite); 3. – Plasmocite; 4. – Macrofag central înconjurat de plasmocite (insulă imunologică); 5. – Amprentă de ganglion limfatic; 6. – Secțiune de ganglion limfatic; fragment din zona corticală; se observă capsula şi doi foliculi limfatici; colorație Van Gieson.



Planşa a VI-a – ASPECTE CITOLOGICE (SÂNGE ŞI MĂDUVĂ) ÎN DIFERITE TIPURI DE ANEMII

1. – Sferocite (în stânga); ovalocite (în mijloc); megalocite (în dreapta); 2. – Anulocite (în stânga); eritrocite în semn de tras la ţintă (în mijloc); eritrocite fragmentate (în dreapta); 3. – Eritrocite în picătură (în stânga); inel Cabot (în mijloc); eritrocite cu corpi Heinz (în dreapta) (colorație albastru de Nil); 4. – Testul de siclizare: în stânga negativ (eritrocite normale); în dreapta pozitiv (eritrocite în seceră = siclemie; microscopie în contrast de fază (×512); 5. – Anemie feriprivă (măduvă): eritroblaşti feriprivi; 6. – Anemie megaloblastică (măduvă): megaloblaşti, mitoză.

Notă: Microfotografiile din planşele I–VI provin din colecțiile Dr. S. Nicoară şi Dr. Constanța Ursea; fotografia A. Eugeniu; mărire originară: ×3200; colorație May-Grunwald.

Excepțiile la mărire şi colorație sunt menționate la legendele respective.

Testul de excreție a cobaltului rar folosit în practică, se bazează pe constatarea că există o corelație strânsă între absorbția fierului și a cobaltului în intestinul subțire (122). Dar, în timp ce fierul este utilizat în căile metabolismului său, cobaltul este excretat prin urină. Metoda reflectă deci indirect absorbția intestinală a fierului, care la rândul său oferă informații asupra situației depozitelor de fier (a se vedea testul de absorbție a fierului) (122).

Pe lângă aprecierea fierului circulant și a depozitelor de fier, investigația metabolismului fierului mai include examinarea *sideroblaștilor medulari și a siderocitelor,* ce reflectă situația fierului intracelular folosit sau nu.

Se știe că un sideroblast normal conține granule de feritină ce provin din fierul rămas nefolosit în urma sintezei hemului în mitocondria eritroblastului. Acest fier este captat de apoferitina din citoplasma eritroblastului și formează granule de feritină. În general, aprecierea se face prin raportarea de eritroblaști cu granule de feritină la 100 eritroblaști. Dar nu numai numărul lor contează, ci și numărul și mărimea granulelor de fier. Astfel prezența de peste 5 granule de feritină în citoplasma unui sideroblast este considerată ca o situație patologică (52, 127). Sideroblaștii inelari care au micelii feruginoase în mitocondrii și dispunerea granulelor de fier perinuclear, sunt de asemenea considerați patologici. Ei reprezintă stigmatul morfologic al anemiilor sideroblastice (52).

La subiecții normali, 30—50% din eritroblaștii măduvei osoase sunt sideroblaști. În anemia feriprivă aceștia scad sub 10%, în anemia din bolile cronice sunt în jur de 12—15%, în talasemie sunt peste 50%, în anemiile sideroblastice idiopatice sunt peste 50%, din care cel puțin peste 15% sunt inelari (12).

Determinarea numărului de siderocite (eritrocite cu granule de fier) este mai puțin utilizată; ea nu reflectă corect situația sideroblaștilor din măduva osoasă, deci situația fierului intracelular, deoarece trecând prin filtrul splinei, siderocitele pot pierde granulele de fier (33, 127, 128).

Investigarea sintezei protoporfirinei. Cel mai frecvent se cercetează protoporfirina liberă eritrocitară (PLE). În condiții normale se sintetizează mai multă protoporfirină în mitocondriile eritroblaștilor decât este necesară pentru formarea hemului. Excesul de protoporfirină rămâne în celulă și este curent desemnată ca PLE care, la subiecții normali, are valori între 15 și 80 μg/dl de eritrocite. Metoda de determinare simplificată a arătat creșteri importante (de 5 ori valorile normale) în anemia feriprivă, în anemia din bolile cronice, valori normale în talasemie și valori ce variază cu natura leziunii în anemiile sideroblastice (116). Astfel, în anemia sideroblastică ereditară, PLE este scăzută ca și în anemiile prin deficit sau răspuns la piridoxină, deoarece blocajul sintezei protoporfirinei are loc în prima porțiune a lanțului de sinteză (piridoxal 5′ — fosfat și deltaaminolevulin sintetaza) (63, 116). În anemia refractară sideroblastică idiopatică PLE crește, deoarece blocajul are loc la capătul terminal al sintezei, adică la nivelul hemsintetazei ce leagă molecula de protoporfirină cu fierul bivalent pentru a forma hemul (120). În cazuri cu blocarea hemsintetazei s-au găsit creșteri marcate de PLE

până la 1 750 µg/dl eritrocite (75). Creşteri semnificative de PLE s-au întâlnit şi în intoxicaţia cu plumb (116, 118).

Alte anomalii în sinteza protoporfirinei, cum ar fi creşterea acidului deltaaminolevulinic sau a coproporfirinei urinare sunt patognomonice pentru intoxicaţia cu plumb şi vor fi expuse în detaliu la capitolul „Anemii sideroblastice" (118).

Investigaţia sintezei globinei se face în modul cel mai simplu prin electroforeza Hb. Există însă în prezent o metodologie nouă şi amplă de cercetare a sintezei globinei ce include metoda de genetică moleculară, studiul secvenţei nucleotidelor din ADN celular ca şi a secvenţei aminoacizilor în hemoglobinopatii, aspecte care sunt expuse la capitolul respectiv. Electroforeza Hb rămâne încă metoda curentă în cercetarea anemiilor hipocrome, ce evidenţiază creşterea HbA2 în talasemia minoră şi HbF în forma majoră (16). Tot prin electroforeza Hb se detectează HbC, HbE şi HbH (127).

Denaturarea la cald se utilizează pentru cercetarea hemoglobinelor instabile (127).

Planul de investigaţie a unei anemii hipocrome este expus în figura XXI.2.

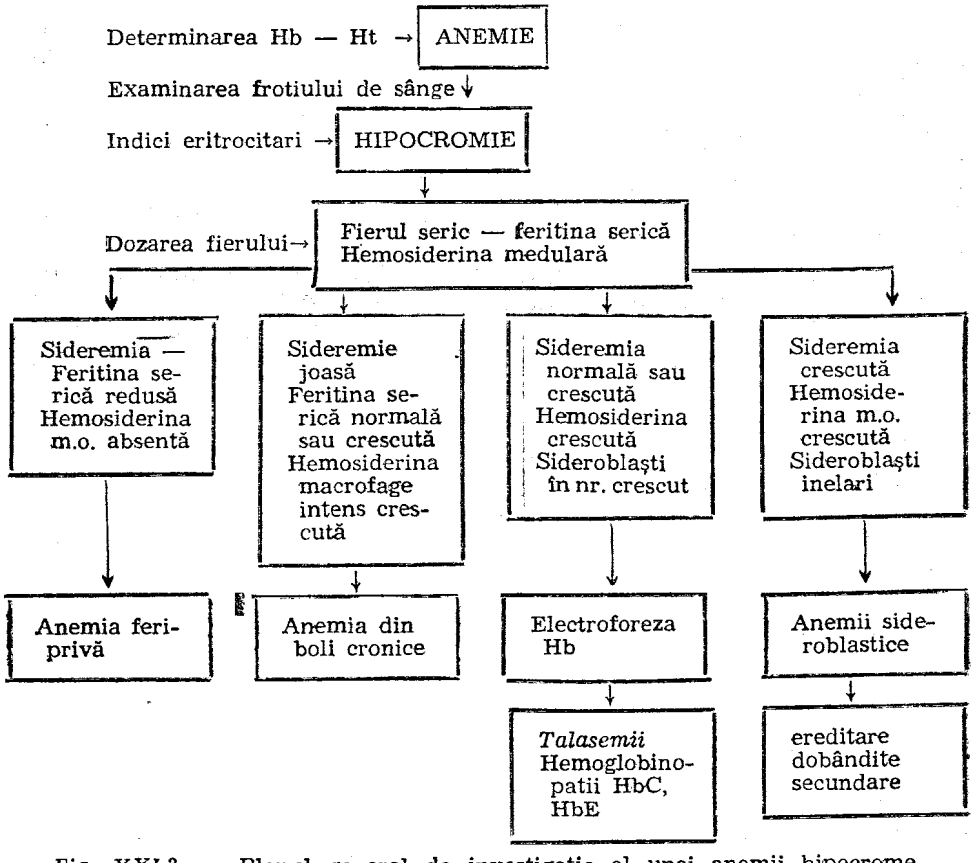


Fig. XXI.2. — Planul general de investigaţie al unei anemii hipocrome.

I. ANEMII INDUSE DE TULBURĂRI ÎN METABOLISMUL FIERULUI

A. ANEMIA FERIPRIVĂ

(anemia prin deficit de fier, anemia prin carență de fier)

Definiție — istoric. Anemia feriprivă este tipul de anemie hipocromă în care deficitul de sinteză a hemoglobinei are drept cauză *scăderea cantității totale a fierului din organism.* Această tulburare fundamentală este răspunzătoare de toate simptomele și semnele bolii.

Scăderea cantității totale de fier din organism reduce semnificativ aportul de fier la măduva osoasă și are ca urmare anemia microcitară, hipocromă caracteristică; de asemenea, scăderea fierului tisular este responsabilă de semne și simptome revelatoare ca modificările de fanere, atrofia mucoaselor, astenia etc., caracteristice acestui tip de anemie.

Boala atinge ambele sexe și toate vârstele, dar predomină la femei și copii. Este cea mai frecventă formă de anemie.

Istoric. Manifestările clinice ale deficitului de fier au fost recunoscute de mult timp. Astfel la 1500 A.C. a fost descrisă în Egipt, într-un manual de medicină, o boală caracterizată prin paloare, dispnee, edeme (127).

Ulterior, utilizarea terapeutică a fierului a fost menționată în mitologia greacă.

Utilizarea specifică a fierului a fost atribuită lui Sydenham care în jurul anului 1700 l-a recomandat în tratamentul clorozei. Cloroza fusese descrisă încă din 1554 de către Johannes Lange sub denumirea *„De morbo virgineo"*, observată la fete tinere între 14 și 17 ani (127).

În 1830 au fost corelate anemia, hipocromia și carența de fier, de către Hoefer. În 1832 Pierre Blaud a descris răspunsul favorabil al clorozei la pilulele de sulfat feros plus carbonat de potasiu.,

Scăderea incidenței clorozei spre sfârșitul secolului al XIX-lea a fost corelată cu perimarea modei corsetului, larg utilizat în secolul al XVIII-lea. Efectul negativ al corsetului era atribuit unei esofagite de reflux care ducea la pierderi de sânge căreia i se adăuga dieta alimentară lipsită de carne, obișnuită în acea epocă (127).

În primele două decade ale secolului nostru s-a identificat anemia hipocromă cronică la femei în jur de 50 de ani, provocată de menoragiile ce apăreau în perioada de premenopauză.

Ulterior, anemia hipocromă feriprivă a fost deosebită de celelalte tipuri de anemii.

Incidența. Deficitul de fier este cea mai răspândită cauză de anemie în toată lumea, în special la copii, tineri în creștere, cei cu alimentație necorespunzătoare, femei (34, 79, 98).

După datele Organizației Mondiale a Sănătății, carența de fier afectează 30% din populația globului, aproximativ 1,3 miliarde de locuitori (34, 77).

Carența de fier este întâlnită la 43% din copiii preșcolari, 37% copii de școală (în creștere) și 51% femei gravide.

În tabelul 21.IV este redată prevalența deficitului de fier pe grupe de vârstă și sexe.

S-au efectuat numeroase studii populaționale asupra deficitului de fier în diferite țări.

Astfel în S.U.A., 24% din fetele tinere aveau depleția depozitelor de fier, iar 42% aveau depozite suboptimale (34).

În Finlanda, aceleași studii au constatat depleția depozitelor de fier la 4—7% bărbați, 70% femei între 15 și 49 de ani și 23% femei peste 50 de ani (34).

În Canada, cercetări ce au folosit dozarea feritinei serice pentru aprecierea stării depozitelor de fier au constatat, pe 1 105 subiecți, depleția depozitelor de fier la 25% copii, 30% adolescenți, 30% femei în perioada menstruală, 60% la gravide și numai la 3% bărbați.

În Germania, un studiu pe 1 066 subiecți, 64,7% femei au avut grade variate de deficit latent de fier și 13,9% anemie feriprivă, în timp ce numai 10% din bărbați au avut deficit latent de fier și numai 2% anemie feriprivă (34).

În Suedia, prevalența deficitului de fier la femei ajunge la 30% și doar 1—2% la bărbați.

Deficitul de fier este comun copiilor în primii 2 ani de viață și scade ca incidență după 5 ani.

TABELUL 21.IV

Incidența deficitului de fier pe sexe și grupe de vârstă

Grupa de vârstă	B%	F%
1—2 ani	9,2	9,2
3—10 ani	6,1	6,1
11—14 ani	3,5—12,1	6,1
15—44 ani	2,0	2,5—14,2
45—80 ani	2,0	6,1

Frecvența deficitului de fier în diferite țări
(anemie feriprivă %)

Țara	Bărbat adult (%)	Femeie adultă (%)	Femeie gravidă (%)
India	6	35	56
Mexic	0,9	12	27
Venezuela	1,9	15	37
Israel	14	39	47
SUA	—	17	50

Stadiile evolutive ale deficitului de fier. Tulburarea balanței fierului începe cu depozitele de fier care suferă o depleție treptată până la epuizare și se continuă cu reducerea semnificativă a aportului de fier la măduva osoasă care este ultimul stadiu al deficitului, când apare anemia.

Dezvoltarea unei anemii feriprive se poate astfel prelungi luni sau chiar ani până la apariția anemiei manifeste.

În deficitul prelatent de fier, ce precede anemia, depozitele de fier din macrofage au o valoare subnormală și singura modificare biochimică este *scăderea feritinei serice*. Crește rata de absorbție a fierului dovedită prin testele menționate anterior, ceea ce face ca nivelul fierului seric și cantitatea de Hb/dl să fie încă normale (23, 32).

Deficitul latent de fier se caracterizează prin reducerea marcată sau epuizarea depozitelor de fier. Concomitent crește evident absorbția fierului intestinal, scade concentrația fierului seric, scade saturația transferinei în fier (menținându-se însă peste 16%), turnover-ul fierului plasmatic și protoporfirina eritrocitară liberă cresc. Cifra de Hb/dl se menține încă în limite normale. Scăderea feritinei serice concordă cu situația depozitelor de fier.

Eritropoieza cu deficit de fier — anemie cu deficit de fier este ultima etapă a stadiilor evolutive, fiind stadiul cel mai avansat al deficitului de fier; pe lângă absența depozitelor de fier, scăderea marcată a feritinei serice sub 10 μg/l, scăderea fierului seric, a saturației transferinei sub 16%, creșterea foarte mare a turnover-ului fierului plasmatic și a protoporfirinei eritrocitare libere, apare anemia microcitară hipocromă (23).

În figura XXI.3 sunt prezentate grafic stadiile evolutive ale deficitului de fier.

În tabelul 21.V sunt expuse sinoptic caracterele diferențiale ale acestor stadii.

Etiologie și patogenie. Deficitul de fier apare în următoarele trei situații:

1. Pierderi crescute de fier *(balanță negativă)* prin sângerări cronice.
2. Aport insuficient de fier pentru nevoile fiziologice.
3. Creșterea necesităților (consumului) de fier.

Toate aceste trei situații duc la deficitul de fier ai cărui factori etiologici sunt expuși sinoptic în tabelul 21.VI.

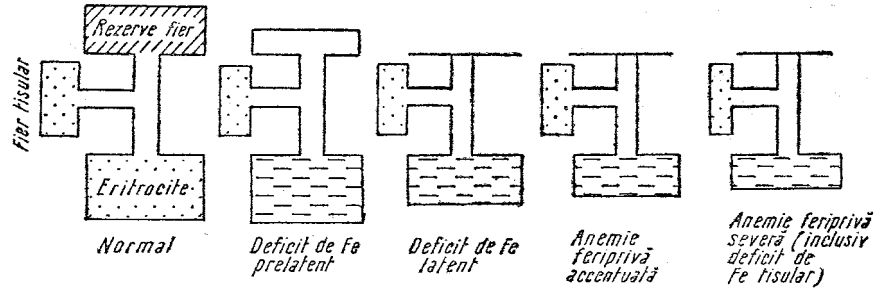


Fig. XXI.3. — Stadiile evolutive ale deficitului de fier. Se remarcă inițial scăderea depozitelor de fier, apoi apariția anemiei, iar în final anemie severă.

1. **Pierderile crescute de fier.** A. *Sângerări ale tractului digestiv.* La bărbați și la femeile după menopauză cea mai frecventă cauză a deficitului de fier este reprezentată de sângerări gastrointestinale: ulcerul gastric și duodenal, hernia hiatală, gastrita alcoolică sau medicamentoasă (aspirină), *hemoroizii,* anomalii vasculare, neoplasme etc.

TABELUL 21.V

Stadiile deficitului de fier

Stadiul	Depozite de fier în macrofage	Fier plasmatic	Anemie	Hipocromie și microcitoză	Alte tulburări
Normal	normal	normal	absentă	absente	—
Deficit de fier prelatent	reduse	normal	absentă	absente	crește absorbția fierului (^{59}Fe)
Deficit de fier latent	absente	redus	absentă	parțiale	crește absorbția ^{59}Fe, crește turnover ^{59}Fe crește PLE*
Anemia feriprivă incipientă	absente	redus	moderată	parțiale	idem plus oboseală cronică
Anemia feriprivă severă	absente	mult redus (sub 16% saturația)	severă	severe	idem plus modificări fanere

* PLE = protoporfirina liberă eritrocitară.

TABELUL 21.VI

Factorii etiologici ai carenței de fier

I. *Pierderi crescute de fier*	*Frecvența (%)*
1. Sângerări gastrointestinale	56
— hemoroizi	10
— corticoizi și antiinflamatoare nesteroidiene (aspirină ș.a.)	8
— ulcer gastroduodenal	7
— hernie hiatală	7
— diverticuloză	4
— neoplasme	2
— colită ulceroasă	1
— verminoză intestinală	1
— alte cauze	16
2. Pierderi menstruale excesive	29
3. Donare de sânge	—
4. Hemoglobinurie	—
5. Telangiectazie ereditară	1
6. Tulburări de hemostază	—
7. Autosângerarea	—
II. *Aport insuficient de fier*	
1. Dietă inadecvată (sugar)	19
2. Malabsorbție	
— aclorhidrie	41
— stomac rezecat	10
— boala celiacă	6
III. *Necesități crescute de fier*	
— creștere (sugari—copii)	—
— sarcină	6
— lactație	—
IV. *Cauză necunoscută* („idiopatice")	17

În hernia hiatală sângerarea cronică duce la anemie între 8 și 38% din cazuri, îndeosebi la herniile mari cu eroziuni lineare (leziuni „Cameron") și mai ales în cele paraesofagiene. Hemoragia este consecutivă leziunilor erozive de la gâtul sacului herniar sau unor eroziuni, deși nu întotdeauna leziunea poate fi demonstrată prin esofagogastroscopie (24); a fost descrisă și o formă anemică a herniei hiatale.

Gastrita hemoragică provocată de ingestia de medicamente este o altă cauză de sângerare digestivă. Cel mai des este incriminată aspirina, urmată de corticosteroizi, antiinflamatoare nesteroidiene, reserpină. La o doză între 2 și 6 g aspirină/zi, 70% din bolnavi au prezentat hemoragie digestivă (8). Uneori numai o singură tabletă de aspirină poate provoca o hemoragie. Un studiu endoscopic al mucoasei gastrice a pus în evidență, după ingestia unei tablete de aspirină, apariția în aproape 100% din cazuri de microhemoragii.

Ulcerul duodenal sau gastric poate sângera masiv, dar și ocult; 25% din bolnavii care se prezintă cu hemoragii nu au avut simptome anterioare. De asemenea, 50% din bolnavii cu ulcer gastroduodenal au episoade hemoragice, unele de intensitate foarte redusă (oculte) care nu necesită transfuzii de sânge, în schimb duc la depleția depozitelor de fier.

În ulcerul gastroduodenal din sindromul Zollinger-Ellison hemoragiile pot fi abundente (8, 128).

Varicele gastrice și esofagiene sunt însoțite frecvent de sângerări severe, uneori prelungite și repetate.

Cancerul gastric poate de asemenea sângera ocult, ca urmare a ulcerațiilor frecvente ale tumorii. Anemia feriprivă poate fi primul semn clinic ce atrage atenția.

Sângerarea prin tumori maligne gastrice reprezintă 2% din cauzele de deficit de fier.

Rezecția gastrică pentru ulcer gastroduodenal poate induce un deficit de fier, nu numai prin malabsorbție, ci și prin sângerări oculte. Studii cu Cr^{51} au decelat pierderi zilnice de sânge la acești bolnavi, între 3,2 și 6,5 ml/zi (normal sub 2 ml/zi).

Ectazia vasculară a antrului gastric are un aspect caracteristic endoscopic de „stomac cu aspect de miez de pepene verde" (28).

Tumorile intestinului subțire (leiomioame, polipii adenomatoși etc.) pot fi de asemenea o sursă de sângerare.

Enterita după iradierea terapeutică a abdomenului poate fi însoțită în evoluția sa de sângerare.

Diverticuloza colonului provoacă sângerare în 5—8% cazuri, iar diverticulita în 15—25%.

Carcinomul cecului are o evoluție lentă până la apariția anemiei care poate fi prima manifestare clinică a neoplasmului.

În *colita ulceroasă* 81% din bolnavi au anemie feriprivă, cu pierderi zilnice de sânge între 6 și 25 ml/zi.

Verminozele intestinale (tenia, ankilostoma duodenală, infestarea masivă cu tricocefali etc.) afectează 20% din populația globului. Un vierme consumă 0,05 ml sânge pe zi. Existența a 100 de viermi cu o pierdere de sânge de 5 ml pe zi duce în mod sigur la anemie (35).

Telangiectazia ereditară Osler-Rendu poate avea și localizări gastrointestinale cu o sângerare similară celor din alte zone (sublingual, cutan etc.).

Sângerarea din telangiectaziile intestinale a fost observată și în sclerodermie și sindromul Turner (28).

Leziunile de angiodisplazie se pot afla în oricare parte a tractului intestinal, mai ales în cec și colonul ascendent (28).

Hemoroizii constituie, prin sângerări repetate, adesea oculte, o cauză frecventă de deficit de fier.

Hemoragia în vezicula biliară și *hemobilia* sunt rare, dar posibile ca urmare a unor malformații vasculare sau traumatisme hepatice și creează probleme grele de diagnostic.

Defectele hemostatice, în special cele legate de disfuncții plachetare, sunt însoțite de sângerări digestive. Sângerarea intestinală este frecventă în boala von Willebrand. Desigur se va căuta și o leziune locală (128).

Sângerarea prin ingestie de lapte de vacă la copil. Laptele de vacă poate induce o enteropatie prin hipersensibilitate alergică cu pierdere de proteine și sângerare. De aceea se recomandă evitarea administrării laptelui de vacă integral în primul an de viață (46).

Diverticulul Meckel poate provoca hemoragii severe intestinale mai ales că la examenul radiologic al intestinului poate fi uneori trecut cu vederea.

Transfuzia fetomaternală este o trecere a sângelui fătului în circulația sanguină maternă, fapt ce se întâlnește în 50% din cazuri. În 10% din cazuri pierderile sunt mari, în jur de 40 ml și doar în 1% sunt masive, peste 80 ml. Raportate la volumul sanguin al fătului, aceste pierderi îi pot provoca anemii severe.

B. *Sângerări ale aparatului urogenital* (64, 74). *Sângerarea menstruală.* La femei, cauza cea mai frecventă de anemie feriprivă o reprezintă sângerările genitale. Cantitatea medie de sânge pierdut la o menstruație normală este de 40 ml pe ciclu (64). Doar 10% din femei au pierderi menstruale ce depășesc 80 ml sânge — la un ciclu. Există însă cazuri în care volumul pierderilor de sânge menstrual ajunge până la 495 ml la femei sănătoase, neanemice și care nu își consideră ciclul anormal.

Cantitatea de fier pierdută în cursul unui ciclu menstrual variază în raport cu durata și cantitatea de sânge pierdută, între 10 și 30 mg, când pierderea de sânge este apreciată între 20 și 60 ml. O pierdere lunară de sânge de peste 100 ml duce, de regulă, la o anemie feriprivă.

Utilizarea de sterilete poate crește cantitatea de sânge menstrual mai ales în primul an de aplicare.

În general, cu o dietă obișnuită cu 10 mg fier pe zi, balanța fierului la femei în perioada menstruală este precară.

Există câteva criterii de apreciere a pierderilor menstruale cum ar fi: imposibilitatea de a controla pierderile prin tamponare, utilizarea a peste 4 tampoane pe zi, prezența de cheaguri mai mari de 2 cm ce apar chiar în prima zi, durata menstrelor ce trece de 7 zile (64).

În cursul sarcinii femeia pierde în jur de 650 mg fier, prin transfer de fier către făt (350 mg) și prin placentă, cordonul ombilical și la naștere (în jur de 300 mg).

Sângerarea genitală excesivă este întâlnită de asemenea în fibromul uterin și neoplasmul uterin.

Sângerările tractului urinar se întâlnesc în litiaza renală, în neoplasme renale, în afecțiuni inflamatorii ale ureterului și vezicii urinare.

C. *Sângerări ale aparatului respirator.* Hemoptizia recurentă, ca și anomaliile congenitale ale trectului respirator, mai ales cele vasculare, endobronșice, infecțiile cronice bronșice, boala mitrală, cancerul pulmonar pot — datorită hemoptiziilor — să inducă un deficit de fier. Epistaxisuri repetate pot provoca, de asemenea, un deficit de fier. La aceste boli se poate adăuga hemosideroza pulmonară și/sau sindromul Goodpasture. Deseori în aceste boli nu se observă hemoptizia, deoarece bolnavul poate înghiți sputa hemoptoică (20).

Donarea de sânge. Fiecare flacon de 500 ml sânge conține 250 mg fier, astfel că 3—4 donări de 500 ml pot provoca un deficit de fier și la subiectul sănătos, dacă nu se face profilaxia carenței de fier (vezi cap. Tratament) (1).

Hemoglobinuria paroxistică nocturnă se asociază cu pierderi echivalente cu 1,8—7,8 ml/zi. Pierderi similare au loc la *bolnavii cu proteze valvulare,* prin hemoliza mecanică intravasculară și hemoglobinuria ce urmează acesteia (23, 88).

Anemia factițioasă este o autosângerare întâlnită la femei nemăritate cu ocupații paramedicale (42). Sângerarea este produsă prin venopuncții sau exagerarea sângerărilor prin leziunile unor hemoroizi preexistenți, sau ale tubului digestiv provocate cu ace de tricotat sau ingestii de anticoagulante. Bolnavii din această categorie sunt refractari la tratament, au adesea un sindrom depresiv, cu idei de sinucidere și necesită un tratament psihiatric (42).

Deficitul de fier iatrogen este provocat de investigații multiple ce impun flebotomii repetate.

Deficitul de fier la alergătorii de cursă lungă este indus prin sângerări gastrointestinale (100).

Anemia feriprivă „idiopatică" reprezintă 17% din cazuri în care nu s-a putut decela de la început cauza sângerării. Bolnavul trebuie tratat și controlat periodic (6 luni). Sunt numeroase situațiile când chiar examenul radiologic trece peste o leziune mai ales intestinală sau nu s-a efectuat examenul intestinului subțire. Etichetarea drept idiopatică a anemiei este de obicei temporară.

2. **Aportul insuficient de fier.** *Deficitul de fier în alimentație.* Alimentația obișnuită la adult conține 6 mg fier la 1 000 calorii, cantitatea de fier totală într-un regim alimentar normal fiind de 10—20 mg pe zi, din care se absoarbe doar 10%. Această rație alimentară nu duce la carență de fier deoarece din cantitatea totală de fier se absoarbe doar 10%, cât este necesar organismului; adăugarea de fier în făină, care se practică în unele țări, nu este necesară (23, 82, 127).

Există însă situații, la copii și adulți, când aportul de fier prin alimentație este sub valorile menționate.

La copii, deficitul de fier este rezultatul utilizării unor programe de alimentație cu lapte, la care nu s-a adăugat fier (9, 80).

În primul an de viață, copilul născut la termen necesită 160 mg fier, iar copilul prematur 240 mg — pentru eritropoieză. Aproximativ 50 mg

provin din distrugerea fiziologică a eritrocitelor ce are loc în prima săptămână de viață. Produsele de lapte sunt foarte sărace în fier și hrănirea prelungită a sugarului cu laptele mamei duce treptat la carență de fier dacă rația alimentară nu se suplimentează cu fier, mai ales la imaturi și gemeni, deoarece și ei sunt subponderali la naștere; acestei cauze i se adaugă transfuzia de sânge din placentă de la un monozigot la celălalt. Nou-născuții mai pierd în plus o cantitate de sânge prin secționarea cordonului ombilical (9).

La copiii mai vârstnici, alimentația săracă în fier poate contribui la apariția anemiei feriprive, dar se pot adăuga și alți factori, ca parazitoze intestinale sau eventuale sângerări gastrointestinale.

În tabelul 21.VII sunt expuse datele asupra aportului de fier în rația alimentară pentru diferite categorii de copii și adulți pe grupe de vârstă.

În alimente, fierul este prezent în cantități și forme chimice diferite.

Cantități mari de fier se găsesc în carne și organe. Astfel, ficatul și rinichiul conțin până la 135 mg/1 000 Kcal. Carnea macră are 13—25 mg/1 000 Kcal. Peștele, ouăle, crevetii conțin cantități relativ mici de 12—16 mg/1 000 Kcal (127, 128).

Dintre legume și zarzavaturi cea mai mare cantitate se află în pătrunjel — 186 mg/Kcal și spanac — 142 mg/Kcal, iar dintre rădăcinoase, ridichile au 70 mg/1 000 Kcal.

Cerealele conțin cantități mici de fier, motiv pentru care în unele țări făina de grâu este îmbunătățită cu 40 mg fier/kg ceea ce aduce în această pâine circa 28 mg Fe/kg. Pâinea capătă însă un gust particular, iar fierul se poate lega de fitați, substanțe chelante, care fac ca absorbția acestui fier să fie practic redusă. Chiar spanacul ce conține cantități mari de fier și are o reputație adecvată, conține de fapt numeroși chelanți de fier neabsorbabili (127, 128).

TABELUL 21.VII

Aportul de fier din alimentația uzuală pe diferite grupe de vârstă și sex

Grupe de vârstă și sex	Aport fier (mg/zi)	Cantitatea fier (mg) recomandată/zi
Sugar 6—11 luni	11,9	15
Copil 2 ani	8,4	15
Fete 14—16 ani	10,7	18
Femei 25—30 ani	10,4	18
Femei 60—65 ani	10,2	10
Copii 14—16 ani (sex masculin)	17,2	18
Bărbați 25—30 ani	15,9	10
Bărbați 60—65 ani	14,4	10

În tabelul 21.VIII sunt expuse cantitățile de fier raportate la 100 mg alimente și la 1 000 Kcal.

În general, aproape în toate țările alimentația copiilor și femeilor are o balanță negativă, neacoperind necesitățile zilnice de fier. La bărbați, rația alimentară este echilibrată.

Tulburări ale resorbției fierului scad de asemenea aportul de fier. Un deficit de fier este frecvent în achilia gastrică și în anaclorhidrie. Acidul clorhidric poate elibera fierul din complexe organice conținute în alimente, facilitează absorbția fierului feric și nu are efect pe cel feros și cel heminic.

TABELUL 21.VIII

Conținutul în fier al unor alimente raportat la 100 g aliment și la 1 000 Kcal

	Fier mg/100 g	Fier mg/1 000 cal.
I *Grupa legume*		
fasole verde	1,1	32,4
varză albă	0,5	15,6
salată verde	0,7	41,2
pătrunjel	8	186,0
ardei verde	0,7	31,8
spanac	3	142,9
tomate	0,5	25,0
II *Fructe*		
mere	0,3	4,8
mere uscate	4,5	18,2
banane	0,3	5,4
portocale	0,5	6,1
pere	0,2	3,5
struguri (stafide)	2,1	7,3
căpșuni	0,7	17,9
III *Carne — produse de carne*		
porc	2,3	5,9
vițel	2,9	16,2
pasăre	3,2	24,6
ficat porc	18,0	134,3
ficat vițel	10,0	75,8
ouă	2,5	16,0
rinichi porc	8,0	70,2
IV *Cereale — pâine*		
făină grâu	5,0	14,2
paste făinoase	1,0	2,1
V *Lapte*		
brânză	0,3	0,9

În rezecțiile gastrice parțiale și în special în cele totale pentru ulcere gastroduodenale și neoplasme sau în gastroenteroanastomoză, carența de fier este frecventă, datorită ocolirii duodenului de către alimente, ca și lipsei acidului clorhidric. Deficitul este mai frecvent în rezecția de tip Billroth II sau Polya și mai puțin întâlnit în rezecția de tip Péan (98, 127).

Tulburări de resorbție a fierului apar și în afecțiuni gastrointestinale cu pasaj intestinal accelerat.

În boala celiacă (sprue, steatoree idiopatică, sensibilitatea la gluten) anemia este predominant feriprivă și uneori megaloblastică. Defectul constă în reducerea enzimelor cu fier din mucoasă (citocrom, citocrom-oxidază etc.). Concomitent absorbția grăsimilor este mult redusă (127).

În „sindromul Pica", ce se caracterizează prin geofagie, amilofagie (amidon) și pagofagie (gheață) întâlnit la subiecți cu carență gravă de fier, există un cerc vicios deoarece ingestia de amidon sau lut are efectul unei rășini ce interferează și blochează absorbția de fier, realizând finalmente o formă de malabsorbție (107, 127, 128).

Geofagia induce în țările orientale (Egipt, Turcia, Iran) un sindrom caracterizat prin anemie feriprivă, hepatosplenomegalie, hipogonadism și nanism. Se presupune existența unui deficit concomitent de zinc (127).

Aportul insuficient de fier la nou-născut. La naștere cantitatea totală de fier este de 80 mg/kg corp. Deficitul apare de obicei la *imaturi* și la *gemeni*, care și ei sunt subponderali. Secționarea precoce a cordonului reduce de asemenea volumul sanguin al nou-născutului. Cea mai importantă situație de aport redus de fier la nou-născut este însă *carența de fier a mamei.* În această ultimă situație, anemia apare la sfârșitul primului an de viață. Copiii născuți din mame cu carență de fier au cantitatea de fier totală sub 80 mg/kg corp, iar volumul lor eritrocitar este cu până la 20% mai mic decât la copiii născuți din mame fără carență de fier.

De aceea se recomandă ca în alimentația tuturor acestor copii să se introducă precoce feroterapia care de obicei se face după vârsta de 6 luni (80).

3. **Creșterea necesităților de fier** este întâlnită la copiii în creștere, în sarcină și lactație.

La nou-născut, ca și la copil și adolescent, creșterea volumului corporal impune și o creștere a necesităților de fier (80).

În primul an de viață greutatea se triplează, iar masa de eritrocite se dublează. Laptele matern este foarte sărac în fier (0,075 mg/100 ml). De aceea se recomandă ca în primul an de viață să se adauge în alimentație 1,5 mg fier/kg corp (40, 80).

Dacă laptele matern se păstrează în alimentația sugarului peste vârsta de 6 luni, există riscul ca în 30% din cazuri să se producă o carență de fier (40).

Între 12 și 14 ani copiii cresc rapid și au nevoie de 0,5 mg fier în plus/zi (la fete 0,6 mg/zi) (80).

Sarcina și lactația impun de asemenea creșterea necesității de fier. Fătul are nevoie pentru dezvoltarea sa în medie de 350 mg; prin placentă se pierd 150 mg, iar la travaliu încă 175 mg fier. Cum în cursul unei sarcini se pierd 650—675 mg fier, ținând seama că amenoreea economisește în jur de 300—325 mg fier, rezultă că pierderea efectivă de fier din cursul sarcinii și travaliului și deci și necesitățile de acoperire sunt de 350 mg fier (2,6 mg fier pe zi). Necesitățile sunt mai mari în ultimul trimestru și ajung la 3—7,5 mg fier/zi (98, 127).

Lactația crește necesitatea de fier cu 350 mg (2 mg/zi).

Cele mai multe femei însărcinate au condiții de reducere a depozitelor de fier. Depleția de fier în sarcină apare la 85—100% din femeile

însărcinate. De aceea administrarea de preparate cu fier în a 2-a jumătate a sarcinii este pe deplin justificată.

Fiziopatologia deficitului de fier. Pe măsură ce depozitele de fier scad au loc modificări în multe țesuturi. Hemosiderina și feritina din măduva osoasă scad până la dispariție (88).

Treptat scad multe proteine cu fier: citocromul c, citocromoxidaza, dehidrogenaza succinică, mioglobina.

Se semnalează și o reducere a enzimelor fără fier; fosfocreatinina scade, iar fosforul anorganic crește în mușchii scheletici. Activitatea altor enzime mitocondriale crește pe de altă parte în mușchii scheletici ai subiecților cu deficit de fier.

Toleranța la efort este scăzută în deficitul de fier și există o tendință marcată spre acidoză lactică, consecință a scăderii α-lacticodehidrogenazei din mușchii scheletici. S-a mai semnalat, de asemenea, o scădere a NADH, a α-glicerofosfat și succinatoxidazelor musculare. Pe lângă aceste modificări enzimatice, examenul electronooptic al mușchilor striați pune în evidență leziuni severe mitocondriale (88, 127, 128).

Tulburările neuropsihice din deficitul de fier sunt induse prin scăderea activității monoaminooxidazei (MAO) în ficat și în plachetele bolnavului. Se știe că MAO este implicată în sinteza și catabolismul unor neurotransmițători, ca dopamina, norepinefrina și serotonina. Tulburările neurologice și psihice (intelectuale) la copiii cu deficit de fier sunt induse de scăderea MAO. Scăderea atenției, a performanțelor intelectuale, comportament întârziat, lentoarea memoriei, întârzierea în creștere sunt tulburări frecvente la copiii cu deficit de fier. Deficitul de fier provocat experimental la animale (șoareci) este asociat cu o întârziere în creștere, *turnover* crescut al epinefrinei, hipertrofia inimii, reducerea tiroxinei, întârzierea formării dinților.

Deficitul de fier induce tulburări în metabolismul celular al multor altor țesuturi. Mucoasa gastrică își reduce secreția de acid clorhidric și aclorhidria se întâlnește la 43% din bolnavi și nu mai este corectată de administrarea de fier după vârsta de 30 de ani.

Atrofia mucoaselor este de asemenea o consecință a tulburărilor metabolice tisulare din carența de fier (113).

Modificările histologice în deficitul de fier. Sunt afectate îndeosebi celulele proliferante din porțiunea superioară a tractului digestiv (mucoasa linguală, esofagiană, gastrică și a intestinului subțire). Epiteliul mucoasei linguale își reduce grosimea, deși compartimentul celulelor progenitoare are o creștere corespunzătoare. Subțierea este dată de accelerarea exfolierii celulelor epiteliale, urmată de keratinizare. Examenele efectuate prin microscopie optică și electronică nu au arătat însă aberații nucleare și citoplasmatice (113).

Atrofia mucoasei laringofaringiene duce treptat la strictura regiunii postcricoidiene și determină sindromul Plummer-Vinson (disfagie).

Țesutul osos suferă de asemenea în deficitul de fier: lărgirea spațiilor diploe ale oaselor craniului, întârzierea în dezvoltare a șeii turcești etc.

Tabloul clinic. În interpretarea tabloului clinic este util a se avea în vedere că anemia feriprivă este un semn al unei boli care a provocat

deficitul de fier. Uneori boala de bază se manifestă concomitent cu anemia, alteori rămâne ocultă.

Debutul este insidios și progresiunea simptomelor este gradată; bolnavii se prezintă la medic în medie, după o perioadă de 3,3 ani la femei și 1,7 ani la bărbați de la instalarea simptomelor. Dintre bolnavii cu deficit de fier care consultă medicul, 63% se prezintă pentru semne de anemie, 16% vin pentru boala de bază, iar 21% ocazional (69).

Anemia moderată (~10 g Hb/dl) poate fi asimptomatică.

Cercetări pe subiecți cu 8—12 g Hb/dl nu au arătat o corelare prea strânsă între gradul anemiei și oboseală, iritabilitate, amețeli etc.

Bolnavul se prezintă de obicei la medic când Hb/dl ajunge la 7—8 g, deoarece ei au în 80% din cazuri semne legate de anemie, îndeosebi modificări din partea aparatului cardiovascular.

Deficitul latent, echivalent cu scăderea suboptimală a depozitelor de fier, se poate manifesta prin *oboseală* („oboseala gospodinelor", „oboseala elevilor" în perioada de creștere). Tratamentul cu preparate de fier la aceste categorii în paralel cu placebo au demonstrat cert ameliorarea clinică a celor ce primeau preparate cu fier (peroral) (69, 98, 127).

Tulburările cardiovasculare sunt paralele cu gradul de anemie și vârstă: dispnee la efort, palpitații, extrasistole, edeme gambiere datorate hipoxiei tisulare.

Modificări ale epiteliilor. Deficiența de fier induce modificări în structura și funcția țesuturilor epiteliale: piele, fanere, mucoasa lingual, hipofaringe și stomac. Ele pot apărea izolat sau împreună (69, 127, 128).

Pielea este palidă, uscată, se fisurează ușor.

Unghiile devin fragile, se rup ușor, au striuri longitudinale. Caracteristică este aplatizarea, apoi scobirea lor denumită „koilonichie", anomalie ce apare și după ce unghia este expusă la substanțe caustice (soda caustică). A fost cercetat conținutul în fier al unghiilor prin spectroscopie atomică și a fost găsit subnormal, fiind astfel un indicator al depozitelor de fier (fig. XXI.4).

Părul se rupe mai ușor, uneori încărunțește mai repede și poate cădea în cantitate mai mare.

Mucoasa lingual și mucoasa bucală. Atrofia papilelor linguale este un semn caracteristic care se întâlnește și în anemia Biermer. Bolnavul percepe arsuri ale limbii, spontane sau stimulate de alimente sau băuturi acide (113).

Inițial, se atrofiază papilele filiforme din cele 2/3 anterioare ale limbii, apoi întreaga mucoasă lingual, dând limbii un aspect *„lăcuit"* sau *„ceruit"*. Biopsia de mucoasă a confirmat absența papilelor linguale. Modificările sunt reversibile și dispar după 2—3 săptămâni de tratament cu fier (fig. XXI.5) (113).

Stomatita angular (cheiloza) denumită popular „zăbăluță" este de asemenea o manifestare epitelială a carenței de fier, ca și a deficitului de riboflavină.

Disfagia — sindromul Plummer-Vinson se instalează treptat datorită atrofiei mucoasei hipofaringelui la nivelul cartilajului cricoid, în zona joncțiunii între faringe și esofag. Leziunea apare ca o țesătură (o pânză) a mucoasei și poate micșora lumenul faringoesofagului sub forma unei

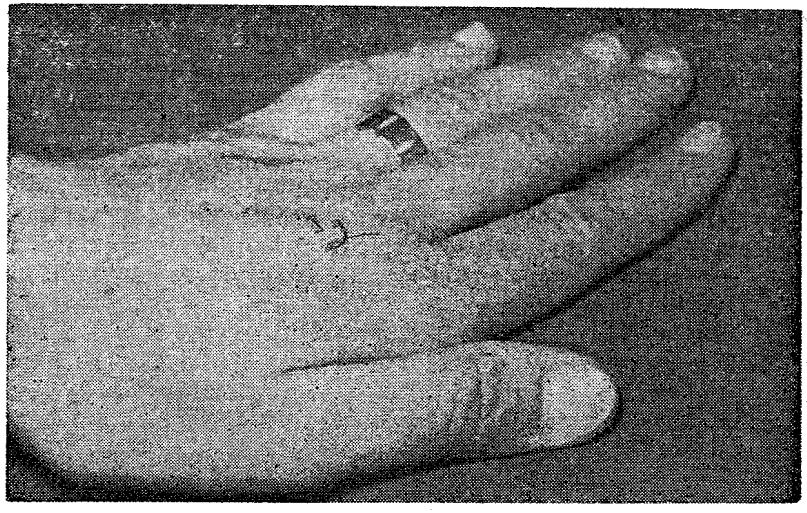


Fig. XXI.4. — Modificări de fanere în anemia feriprivă: koilonichie.

manşete, ajungându-se în carenţa gravă de fier chiar la o adevărată strictură (127, 128).

Disfagia este manifestă la alimente solide şi deloc la cele lichide şi este denumită „sindromul Plummer-Vinson".

Examenul bioptic al mucoasei afectate a arătat că pânza este alcătuită din epiteliu normal, dar ţesutul conjunctiv subiacent este lax, cu o importantă reacţie inflamatorie (69).

Într-o proporţie mică, se observă nuclei hipercromatici cu activitate mitotică crescută în stratul bazal al mucoasei. Biopsia mai pune în evidenţă inflamaţia cronică nespecifică, cu degenerarea muşchiului striat.

Fig. XXI.5. — Depapilarea mucoasei linguale în anemia feriprivă.

În 5% din cazuri s-au decelat leziuni de carcinom. Pentru calmarea disfagiei este necesară uneori dilatarea stenozei (127).

Modificări inflamatorii se întâlnesc și la nivelul mucoasei *esofagiene* contribuind și ele la disfagie (disfagie sideroprivă) și la producerea de spasme esofagene sau ale cardiei.

Modificările mucoasei gastrice. Gastrita hipotrofică a fost demonstrată prin biopsia mucoasei gastrice la 75% din bolnavii cu deficit de fier. Leziunile nu sunt specifice și nu se deosebesc de cele observate în anemia pernicioasă și interesează în special celulele secretoare. Gastrita nu are manifestări clinice, dar se asociază cu reducerea, uneori marcată, a secreției gastrice. Hipoclorhidria a fost demonstrată prin testul cu histamină în 16% din cazuri și hipoclorhidrie severă la 7%. La 13% din bolnavi există anticorpi ai celulelor epiteliale gastrice, care sunt considerați ca o manifestare a gastritei.

La copii s-a observat atrofia mucoasei duodenale și jejunale cu fenomene de malabsorbție pentru grăsimi și steatoree.

Ozena este o atrofie a mucoasei nazale; statistic 70% din bolnavii depistați a avea ozenă au deficit de fier sever (4).

Pica a fost considerată ca o cauză a deficitului de fier, dar în realitate este o manifestare cu totul particulară a acestuia. Se manifestă clinic prin înghițirea de gheață (pagofagie), pământ-lut (geofagie), var sau alimente ce fac zgomot: morcovi, cartofi etc. Apare în 50% din formele foarte severe de anemie feriprivă (107, 127).

Splenomegalia este prezentă la 10% din bolnavi; splina este moderat mărită, fără modificări patologice în organ (127) și revine la normal după corectarea deficitului de fier.

Tulburări genitourinare. Cele mai frecvente sunt tulburările menstruale, menoragii, care sunt ameliorate prin tratamentul cu fier.

Tulburările neuromusculare constau în dureri de tip nevralgic, tulburări vasomotorii, amorțeli și furnicături în membre la 15—30% din bolnavi. În foarte rare cazuri carența de fier poate induce creșterea presiunii intracraniene cu edem papilar și aspect clinic pseudotumoral.

Aceste grave tulburări apar din cauza unei anoxii cerebrale severe, cu edem cerebral, ca în intoxicația cu oxid de carbon, precum și a unor tulburări provocate de carența severă în feroenzimele din țesutul nervos.

Modificări ale scheletului. Leziuni ale calotei craniene similare talasemiei au fost întâlnite la copiii cu deficit de fer (127).

Spațiile diploe ale calotei sunt lărgite și au tăbliile externe subțiate cu striații verticale ce dau aspect de perie.

Există de asemenea și anomalii ale oaselor lungi, ale oaselor metacarpiene și falangelor, caracterizate prin expansiunea medularei și subțierea corticalei. Modificările sus-menționate sunt induse de expansiunea măduvei eritroide.

Investigații de laborator. *Examenul sângelui periferic.* Inițial, carența de fier, în formele cu anemie moderată, induce modificări eritrocitare, ale volumului eritrocitar de fapt, care se traduc prin anizocitoză însoțită de o discretă ovalocitoză. Pe măsură ce deficitul de fier progresează, urmează o anemie normocromă, normocitară (Hb=11 g/dl, VEM=80 μ^3). Ulterior hipocromia, mai ales la copii, este prima modificare importantă

care evoluează paralel cu scăderea cantității de Hb/dl, a cifrei de eritrocite/ml și a VEM (13, 37).

La copii, hipocromia este precoce, deși numărul de eritrocite poate să rămână încă destul de crescut (~4 mil/ml).

Pe măsură ce scade cifra de Hb/dl, hipocromia și microcitoza devin evidente (fig. 21.6).

Hemoglobina este mai mult sau mai puțin scăzută. Numărul hematiilor este proporțional mai puțin scăzut decât hemoglobina, putând fi

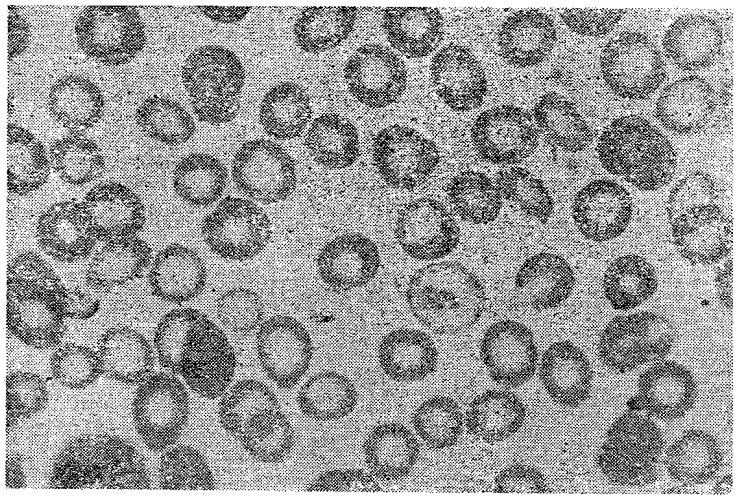


Fig. XXI.6. — Modificări eritrocitare în anemia feriprivă: hipocromia — microcitoza.

uneori chiar normal. Pe frotiul de sânge se întâlnesc anulocite, uneori și celule în semn de tras la țintă, anizocitoză și poikilocitoză. Baza curbei Price-Jones este lărgită. Diametrul hematiilor este redus și se observă leptocitoză (planocitoză, micro- sau macroplanocitoză), anulocitoză. În formele severe de anemie rezistența osmotică a hematiilor este crescută. Reticulocitele sunt în număr normal sau redus. Durata de viață a hematiilor poate fi uneori mai redusă.

Indicii eritrocitari sunt modificați la adult în anemiile medii și severe. În general, scăderea concentrației medii a hemoglobinei pe eritrocit (CMHE) este constantă, iar relația între CMHE și VEM este rectilinie. Există însă o variabilitate mai mare a cifrei de eritrocite și a relației acesteia cu CMHE. Datele furnizate în prezent de aparate tip coulter sau de cele cu „laser" lămuresc complet aceste probleme (13, 37, 95).

Măsurarea distribuției volumului eritrocitar permite o diferențiere a anemiei feriprive de talasemie și de unele anemii din bolile cronice (89, 117). Specificitatea și sensibilitatea indicilor eritrocitari pentru deficitul de fier pot fi mărite însă, dacă lor li se adaugă valorile feritinei serice și saturarea transferinei circulante.

Leucocitele sunt moderat scăzute, între 3 și 4 000/ml la 14% din bolnavi. Leucopenia nu este legată de severitatea anemiei. Formula leucocitară este normală.

Trombocitopenia moderată, întâlnită la circa 28% din cazuri, a fost de asemenea corelată cu deficitul de fier. Trombocitoza observată în circa 30% cazuri este condiționată de sângerări mici, dar active (127).

Măduva osoasă. Scăderea hemosiderinei sau absența ei este caracteristică deficitului de fier și constituie un criteriu sensibil de apreciere a depozitelor de fier; rezultate incerte apar doar la cei ce au primit un tratament cu preparate de fier sau transfuzii de sânge, situații în care apare hemosiderină în macrofagele măduvei (127, 128).

Reducerea hemosiderinei medulare este întâlnită și în leucemia granulocitoră cronică și metaplazia mieloidă cu mielofibroză, fără ca în aceste boli să existe o carență de fier.

Aspectul general al măduvei osoase este normo- sau hiperplazic cu hiperplazie evidentă eritroblastică ce depășește 30% din totalul celulelor medulare și cu predominanța de forme imature. Eritroblaștii sunt mici, bazofili, cu citoplasma franjurată *(„zdrențuită")*, aspect ce a fost considerat caracteristic și denumit *„eritroblastul feripriv"* (fig. XXI.7) (127). Numărul sideroblaștilor este mult diminuat.

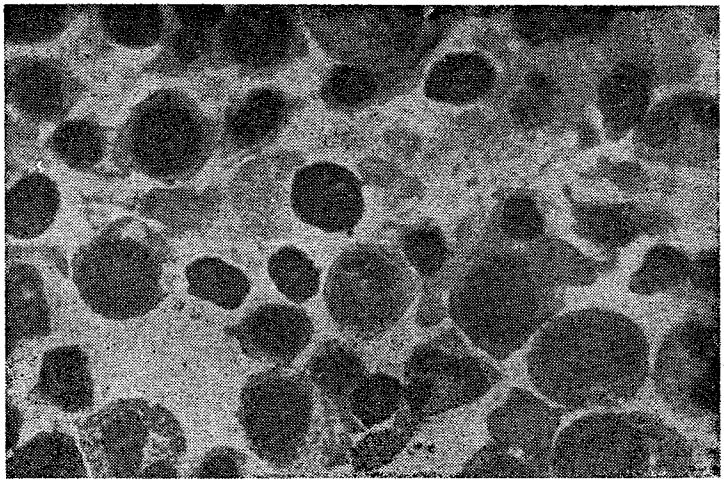


Fig. XXI.7. — Aspectul măduvei osoase în anemia feriprivă: eritroblaști bazofili cu citoplasma „zdrențuită" („feriprivi").

Concentrația fierului seric este subnormală.

Numai în anemia feriprivă și sarcină există o creștere marcată, specifică, a capacității totale de fixare a fierului pe transferină. În celelalte anemii hipocrome capacitatea totală este normală, moderat sau semnificativ redusă.

Feritina serică este mult scăzută. Concentrații sub 10 µg/l sunt caracteristice pentru deficitul de fier. O creștere moderată a feritinei serice are loc în bolile inflamatorii ca în artrita reumatoidă, boala Gaucher, boala cronică de rinichi și în tumori maligne (26). Asocierea anemiei feriprive cu una din bolile descrise mai sus face greu interpretabilă concentrația feritinei serice (26).

Studiile pe serii mari de bolnavi au arătat că totuși la cei cu manifestările sus-menționate, dar care au și o anemie feriprivă, o scădere a feritrinei sub 60 µg/l este caracteristică pentru un deficit de fier concomitent (26, 121).

Creșteri ale feritinei serice au loc și în hepatita acută. Administrarea de fier peroral determină creșterea feritinei serice după 2—3 săptămâni. Administrarea de fier dextran determină creșterea feritinei în 24 ore (121).

Feritina eritrocitară este scăzută în deficitul de fier și se corelează cu feritina serică (26).

Scăderea feritinei eritrocitare și în boli cronice o face mai puțin relevantă pentru diagnosticul diferențial cu anemia feriprivă, unde este mult redusă (26, 121).

Precursorii intraeritrocitari ai hemului sunt crescuți din cauza scăderii sintezei de hemoglobină consecutiv aportului scăzut de fier.

Protoporfirina eritrocitară liberă este crescută în deficitul de fier (peste 600 µg/100 ml masă eritrocitară față de valoarea normală de 30—40 µg) ca și în anemia sideroblastică idiopatică cronică și intoxicația cu Pb (115). La fel sunt crescute și copro- și uroporfirina eritrocitare.

Durata de viață a eritrocitelor este normală sau nesemnificativ redusă.

Explorările ferokinetice exprimă o creștere a absorbției fierului.

Clearance-ul fierului plasmatic este rapid, transportul fierului plasmatic este crescut, iar utilizarea fierului este normală (100%) (99).

Testul de toleranță a fierului este mai rar folosit în prezent. El se bazează pe creșterea semnificativă a absorbției fierului în anemia feriprivă. Astfel, administrarea peroral a unei cantități de fier (compus anorganic) este urmată (la bolnavul cu deficit de fier) de o creștere semnificativă a concentrației serice a fierului cu un nivel crescut al platoului concentrației față de subiecții normali sau cu alte anemii (32).

Diagnosticul pozitiv este relativ ușor dacă se iau în considerație datele clinice (anamneza, examenul obiectiv) și paraclinice. Sunt relevante pentru diagnostic: scăderea concentrației fierului seric, creșterea capacității totale de fixare a fierului, absența hemosiderinei medulare, scăderea feritinei serice, toate atestând scăderea cantității totale a fierului din organism (deficitul de fier) (66, 96, 97, 98, 109, 116).

După stabilirea diagnosticului de carență de fier este *absolut necesar a se decela cauza acesteia* (diagnosticul etiologic).

Această etapă impune efectuarea unui examen clinic minuțios și a unor examene speciale pentru a stabili sediul hemoragiilor sau cauzele aportului deficitar de fier.

Examenul clinic și prin explorare paraclinică a tractului digestiv — hemoragii oculte, examen radiologic, endoscopie esogastroduodenală și a colonului, arteriografie percutană retrogradă a arterelor celiace și mezenterice sunt metode uzuale de investigație în anemia feriprivă. Această ultimă metodă este foarte sensibilă și capabilă să demonstreze locurile de sângerare chiar când rata fluxului sanguin, în lumenul intestinal, este sub 0,5 ml/minut (8). Diverticulul Meckel, cauză de sângerare la copii, este pus în evidență, în prezent mult mai eficient, cu metode scintigrafice (8). Dacă toate metodele menționate eșuează în depistarea cauzei sân-

gerării se impune laparotomia exploratorie, deoarece la 10% din cazuri sângerarea digestivă este provocată de un neoplasm. Unii cercetători recomandă chiar și la copiii fără diagnostic etiologic al sângerării digestive, laparotomia, deoarece chiar diverticulul Meckel nu este depistat în 100%, cazuri prin metodele actuale (127).

Efectuarea unui frotiu din spută cu coloraţia Perls poate evidenţia macrofage cu fier în cazul unei hemosideroze pulmonare, în care hemoptizia nu este evidenţiată clinic (105).

Este util a se menţiona că în unele situaţii sângerarea digestivă este favorizată, pe lângă un factor local minor, de o tulburare severă în hemostază; un exemplu îl constituie boala von Willebrand în care există o mare frecvenţă a hemoragiilor digestive, uneori ca manifestare unică a bolii (8).

De asemenea, când nu s-a putut dovedi o sângerare digestivă și nici o circumstanţă de aport deficitar de fier, iar carenţa de fier este certă, nu trebuie uitat că hemoglobinuria paroxistică nocturnă (HPN) poate avea unele forme clinice atipice în care subicterul nu este evident, iar urinile hipercrome trec adesea neobservate (127).

Efectuarea testului Ham și sucroză, ca și determinarea hemosinderinuriei, trebuie să intre în screeningul acestui lot de bolnavi.

În sfârșit, când depistarea sângerării a eșuat, fapt ce se întâmplă în jur de 17% din cazuri, înainte de a lua decizia unei laparotomii exploratorii, se poate adopta o atitudine de supraveghere, cu aplicarea terapiei marţiale și reexaminarea la 3—6 luni (98, 127, 128).

Diagnosticul unei carenţe de fier prin aport insuficient sau necesităţi crescute de fier este mult mai simplu decât în sângerarea digestivă, deoarece situaţiile în care acesta apare sunt mult mai rare și de obicei bine delimitate clinic (vezi etiopatogenia) (66, 88).

Diagnosticul diferenţial al anemiei feriprive este relativ ușor și nu ar pune probleme serioase dacă se porneşte de la un postulat pe care practica medicală l-a impus de foarte mulţi ani: în faţa unei anemii feriprive atât clinicianul internist cât și medicul de laborator trebuie să rezolve problema fundamentală ce se pune în faza iniţială, și anume dacă deficitul sintezei hemoglobinei a avut loc în absenţa fierului sau în prezenţa lui, cu alte cuvinte dacă fierul total din organism este scăzut (deficit de fier) sau este normal ori chiar crescut. Metodele utilizate pentru această etapă au fost expuse mai sus.

Tot în practica medicală, anemia feriprivă trebuie uneori diferenţiată de talasemia minoră, anemia cronică simplă, anemia din boala cronică de ficat, anemia congenitală Shahidi—Diamond, atransferinemii, hemosideroza pulmonară etc.

Diagnosticul diferenţial cu *talasemia minoră* este luat în considerare mai ales în zonele de pe glob unde această boală este frecventă (89, 117). Tot în această categorie intră și diferenţierea de trăsătura HbE, trăsătura Hb Lepore (100). Toate aceste boli au microcitoză, hipocromie, dar cu toată scăderea concentraţiei de Hb/dl, ele au un caracter comun, și anume creșterea cifrei de eritrocite/ml, în jur de 4—5 mil/ml, întâlnită în anemia feriprivă numai la 3% din bolnavi.

O altă trăsătură diferenţială este volumul eritrocitar mediu (VEM) care, în talasemii minore și HbE hemozigotă, are valori mici între 60 și

70 fl, valori care sunt observate de obicei foarte rar în deficitul de fier și numai în formele foarte severe.

Fierul din organism este, în talasemia minoră și hemoglobinopatii, crescut semnificativ. În plus efectuarea electroforezei de Hb pune în evidență HbA_2, HbF_1 sau HbE, Hb Lepore etc. (89, 117).

În prezent, diagnosticul talasemiei minore se face prin măsurarea sintezei lanțurilor de globină.

În clinică, mai dificil de diagnosticat sunt situațiile în care o talasemie minoră și HbH sunt mascate de o carență de fier, frecvent întâlnită atât la noi cât mai ales în zonele unde talasemia, HbH și carența de fier au o mare extindere (89).

Electroforeza hemoglobinei în aceste cazuri nu este concludentă, deoarece odată cu scăderea hemoglobinei scad și HbA_2 sau HbF. Se procedează atunci la tratamentul carenței de fier care reface cifra de Hb, până unde permite defectul de sinteză al globinei și apoi se reface electroforeza Hb care evidențiază HbA_2 sau HbH (89).

Diferențierea de o *anemie hipocromă din bolile cronice nu* pune probleme deosebite, deoarece în această boală hipocromia este moderată sau parțială, eritrocitele sunt normocitare, mai rar microcitare, concentrația de fier seric este subnormală, dar capacitatea totală de fixare a fierului este redusă, iar macrofagele măduvei conțin cantități mari de hemosiderină; nivelul de feritină serică este crescut în anemia din boli cronice (71, 117).

Diferențierea de *atransferinemie congenitală sau dobândită* este ușurată chiar prin raritatea acestor boli și precizată de reducerea capacității totale de fixare a fierului, care este foarte mică (fiind cantitate redusă de transferină), precum și de creșterea depozitelor de fier în ficat, caracteristice pentru atransferinemii (12, 49, 53).

Diagnosticul cu *anemiile cu hemoliză intravasculară* este uneori dificil. Atât în hemoglobinuria paroxistică nocturnă, cât și în boala hemolitică intravasculară observată în cazul protezelor valvulare, eritrocitele au caracter hipocrom, sunt mai fragmentate în cazul protezelor vasculare (cu aspect de „scai"), iar LDH seric crește. Determinarea hemosiderinei urinare reflectă eliminarea constantă de fier. Testele serologice (Ham, sucroză) sunt specifice pentru HPN. Cifra de reticulocite este crescută atât în HPN, cât și la bolnavii cu proteze vasculare (127).

Diferențierea de *anemiile sideroblastice ereditare* se face prin cercetarea fierului seric, a hemosiderinei medulare, ambele crescute în aceste boli, ca și prin prezența sideroblaștilor inelari (21, 52, 98).

Anemia diseritropoietică congenitală se poate însoți de hipocromie moderată, dar mai ales de microcitoză, fiind confundată mai ales cu talasemia minoră. În anemia diseritropoietică congenitală poikilocitoza este marcată, iar VEM este mai mic decât în talasemie și anemia feriprivă (13, 127).

Prezența eritroblaștilor binucleați este caracteristică, când ei predomină în populația eritroidă (127). Fierul seric și medular este crescut, iar electroforeza Hb este normală. În tabelul 21.IX este redat sinoptic diagnosticul diferențial al anemiilor hipocrome.

Evoluție — Complicații. Evoluția este strâns corelată de gradul deficitului de fier, iar complicațiile cardiovasculare sunt favorizate de hipo-

TABELUL 21.IX

Diferenţierea anemiei feriprive de alte anemii hipocrome

Tipul de anemie	Caractere morfologice ale eritrocitelor	Sideremie	Capacitatea latentă de fixare a fierului	Modificări ale porfirinelor	Hemosinderina medulară		Electroforeza Hb	Ferokinetica şi alte modificări
					macrofage	sideroblaşti		
Anemia feriprivă	hipocromie microcitoză schizocitoză relativă	subnormală	crescută	Creşte PLE*	absentă	1—2% sau absenţi	normală	Eritropoieză eficace
Anemia cronică din infecţii şi inflamaţii	hipocromie moderată	subnormală	normală sau moderat scăzută	creşte moderat PLE	intens crescută	5—10%	normală	Eritropoieză ineficace plus hemoliză periferică
Anemii sideroblastice	hipocromie sau caracter „dimorf"	crescută	normală sau scăzută în hemocromatoza asociată	creştere caracteristică de porfirine intermediare pentru fiecare tip de anemie (a se vedea în text)	intens crescută	80—90% cu aspect „inelar"	normală	Eritropoieză ineficace plus hemoliză periferică în anemia saturnină
Talasemii	hipocromie platicite schizocitoză marcată	crescută	normală sau scăzută	creşte PLE	crescută	80% cu numeroase granule	anormală HbA_2 HbF	Eritropoieză ineficace plus hemoliză periferică

* PLE=protoporfirina liberă eritrocitară

xie, mai ales la vârstnici (cu cardiopatie ischemică cronică, insuficiență cardiacă). Hipoxia tisulară este responsabilă de asemenea de *complicațiile neuropsihice*. Atrofia mucoasei gastrice favorizează tulburări gastrointestinale (diaree, constipație etc.), dar și infecții severe cum sunt cele micotice.

Trombozele membrelor inferioare, ale sinusurilor cerebrale, reprezintă alte complicații posibile în carența de fier.

Cancerul gastric este mai frecvent în atrofia mucoasei gastrice din deficitul de fier și din carența de vitamină B_{12}. De asemenea cancerul faringoesofagian este favorizat de leziunile inflamatorii subcricoidiene severe.

Forme clinice. *Cloroza* este forma clinică de anemie feriprivă descrisă încă în secolul al XV-lea la tinerele fete și atribuită purtării corsetului. În realitate, alimentația cu conținut redus în fier, creșterea rapidă corporală, apariția și abundența menstrelor erau cauzele reale ale carenței de fier, corectată de terapia marțială (69, 127) și astăzi rareori întâlnită.

Anemia hipocromă „idiopatică" apare la femei între 30 și 50 de ani. Aclorhidria este caracteristică, bolnavele au trăsături similare cu cele din anemia Biermer cum ar fi culoarea deschisă a ochilor, părul prematur albit, unghiul costal lărgit, antecedente familiale de anemie, istoric cu sarcini repetate și dietă deficitară în fier. Deficitul de fier a fost confirmat în toate aceste cazuri și etichetarea drept „idiopatice" este provizorie. În general, fiind un grup omogen de sex feminin, tot pierderile de sânge menstrual la cele tinere și menoragii la premenopauză la cele din decada a V-a, ar explica în majoritatea cazurilor carența de fier. Terapia marțială și supravegherea bolnavelor cu examene medicale periodice este măsura adecvată ce se recomandă.

Tratament. Terapia anemiei feriprive parcurge obligatoriu 2 etape: 1) înlăturarea cauzei și 2) terapia marțială pentru corectarea anemiei și refacerea depozitelor de fier.

Depistarea cauzei a fost expusă la cap. *diagnostic* și implică utilizarea unor programe complexe de investigații. În aproximativ 17% din cazuri nu se poate depista cauza și atunci se recomandă tratament marțial și controlul medical periodic.

Corectarea anemiei și refacerea depozitelor de fier se face cu preparate ce conțin fier, administrate pe cale orală sau parenterală (31, 70, 127).

Cea mai sigură și ieftină cale este cea orală, motiv pentru care este preferată în practica clinică.

Este bine a se ține cont și de costul preparatului și în acest sens se poate semnala că un gram de fier din sângele perfuzat costă de 800 de ori mai mult, un gram de fier din carne de 350 de ori, iar un gram de fier dextran de 45 de ori mai mult decât un gram de fier administrat peroral.

De aceea perfuziile cu sânge se vor administra cu prudență, cu indicații stricte, avându-se în vedere și expunerea la o infecție cu virusul hepatitei, al HIV etc. Administrarea parenterală are de asemenea indicații limitate.

Tratamentul cu fier peroral. Măsurile dietetice au o valoare practică redusă. Alimentația trebuie să fie variată, cu alimente ce conțin fier în cantități mai mari (legume verzi, carne, ouă etc.). Excesul de carne în regimul alimentar este fără semnificație practică, deoarece o friptură de vacă de 100 g aduce 4 mg fier, iar pentru cele 30 mg fier, necesare în rația alimentară zilnică, ar fi necesar consumul a cel puțin 1 kg carne pe zi (31). Deci, administrarea de fier peroral este absolut necesară, deoarece în deficitul de fier regimul alimentar nu poate singur acoperi necesitățile de fier (31, 45).

Preparatele de fier peroral se găsesc sub diferite forme chimice produse în toate țările. Începerea unui program terapeutic implică cunoașterea următoarelor date (62, 70, 90):

1. Cantitatea de fier elemental pe fiecare tabletă sau drajeu; aceasta trebuie să fie maximum de 50—100 mg, doză ce nu induce tulburări secundare.

2. Fierul din preparat trebuie să fie rapid dizolvat în sucul gastric sau duodenal (pH=5—6). Preparatele capsulate sunt de obicei evitate, deoarece există posibilitatea de a se dizolva în zona în care fierul nu se absoarbe.

3. Preparatele trebuie să conțină fier bivalent (feros), formă sub care fierul se absoarbe la nivelul intestinului subțire.

4. Efectele secundare trebuie evitate, dar nici un preparat nu poate oferi garanție în acest sens.

5. Costul medicamentului trebuie să fie modest, deoarece terapia durează un timp mai îndelungat.

6. Administrarea preparatelor hematinice este contraindicată.

Acidul ascorbic, succinatul, fructoza cresc absorbția, dar produc efecte secundare nedorite și cresc costul preparatului (47, 70, 90).

La adulți, se administrează 150—200 mg fier elemental pe zi împărțit în 3—4 doze, la 1 oră înainte de mese. Deoarece administrarea înainte de mese produce uneori reacții adverse (tulburări digestive), preparatul cu fier se poate administra și la 1 oră după masă, dar absorbția lui se reduce cu 40%.

În tabelul 21.X sunt prezentate preparatele de fier utilizate în țara noastră.

Se recomandă a se evita preparatele însoțite de vitamine, acid folic etc. care, dacă sunt necesare, se pot adăuga separat.

Se mai recomandă ca administrarea perorală să se facă în doze progresive: se începe cu 1/2 din doză în prima zi și se crește doza progresiv în zilele următoare până se ajunge la doza totală.

Rata de absorbție a fierului scade pe măsură ce Hb se normalizează. După ce anemia s-a corectat, se continuă administrarea fierului peroral până la refacerea depozitului (normalizarea sideremiei), deci o perioadă echivalentă cu cea a refacerii cifrei de Hb, în medie 2—4 luni (70).

Efectele secundare apar numai în circa 10% din cazuri: arsuri epigastrice, greață, crampe abdominale, constipație, diaree și sunt adesea exagerate de către bolnavi. Nu trebuie sugerat bolnavului că va avea efecte secundare. În realitate ele nu apar de regulă ($\sim$ 10%). Dacă ele se manifestă, se recomandă reducerea dozei la jumătate sau schimba-

rea preparatului. Se va atrage atenția bolnavului că fierul administrat peroral (31, 70, 90) colorează fecalele în negru.

Lipsa de răspuns la terapia orală poate avea drept cauze: un diagnostic incorect, o afecțiune în plus ce complică anemia, lipsa de cooperare din partea bolnavului, preparat de fier ineficient, continuarea pierderilor de sânge, malabsorbția fierului, administrarea incorectă (31, 70, 90).

TABELUL 21.X

Preparate cu fier pentru administrarea orală și intramusculară (utilizate frecvent în țara noastră)

Preparatul	Forma de prezentare	Cantitatea fier elemental	Doza zilnică*
GLUBIFER	drajeuri cu glutamat feros	22 mg	6—8 drajeuri
FERRO-GRADUMET	drajeuri cu sulfat feros	105 mg	1—2 drajeuri
FUMARAT FEROS	tablete	100 mg	2 tablete
FIER POLIMALTOZAT (produs românesc similar Fe Haussmann)	fiole cu 2 ml de fier hidroxid sol. 5% polimaltozat	100 mg	1 fiolă i.m. zilnic
FERRUM HAUSSMANN	fiole cu 2 ml complex de fier polimaltozat în soluție apoasă coloidală izotonă	100 mg	1 fiolă i.m. zilnic
JECTOFER	fiole de 2 ml complex de fier cu sorbitol și acid citric	100 mg	1 fiolă i.m. zilnic
FERGLUROM	soluție buvabilă în fiole de gluconat feros 2% sau 1%	12 mg 24 mg	1—5 fiole/zi *per os* la adulți

* Doza zilnică se adaptează după necesități și toleranță. Doza totală: a se vedea textul (mai ales pentru preparatele injectabile).

Se va cerceta dacă anemia feriprivă nu ascunde un alt tip de anemie: anemie Biermer, o anemie cronică simplă, talasemie.

Tratamentul cu fier pe cale parenterală, mai scump, mai eficient și legat de unele riscuri, are următoarele indicații: a) intoleranța la preparatele orale; b) necooperarea bolnavului; c) pierderi de sânge necompensate de terapia orală ca, de exemplu, în telangiectazia ereditară; d) colita ulceroasă, stomac rezecat, malabsorbție intestinală; e) corectarea unei anemii feriprive în ultimul trimestru de sarcină (pentru a evita perfuzii

de sânge și mai ales pentru a asigura fătului cantitatea necesară de fier (39, 62, 70, 90).

Cel mai utilizat preparat este fier-dextranul (Fier polimaltozat, Ferrum Haussmann) care din punct de vedere chimic este o suspensie coloidală în care fier-dextranul există sub formă de microsferule de 5 nm (nanomicroni) diametru și cu o masă echivalentă de 73 000 daltoni. Fiecare particulă are un miez dens electronic de oxihidroxid feric înconjurat de un înveliș alcătuit din lanțuri de dextran ce se extind radial din miez. Preparatul este o soluție ce conține 50 mg fier elemental pe ml, ușor acidă (pH 6), brună închis, stabilă (68). Există și alte preparate injectabile: complex ferisorbitol citrat (Jectofer), complex ferigluconat (Ferrilecit) ș.a.

După injecția i.m. de fier-dextran, acesta necesită 72 de ore pentru a fi absorbit în proporție de 50%. Este preluat în plasmă foarte încet (68). Totuși, după 10 zile de la injecție, se poate ajunge la o concentrație maximă în plasmă de câteva sute μg Fe/dl, dar aceasta scade treptat și ajunge la niveluri normale după 3—4 săptămâni. Fierul-dextran este preluat din plasmă de către macrofage și apoi este cedat transferinei pentru a fi transportat la măduva osoasă (68).

Mobilizarea fier-dextranului dintr-o injecție i.m. este lentă, dar și incompletă, deoarece după 1 lună se mai poate afla la locul administrării, 20—35% din cantitatea injectată inițial (68). Rata încorporării sale în hemoglobină este mai înceată decât aceea a coloizilor de hidroxid feric (mai simpli). Disocierea complexului de fier-dextran se petrece în mod lent în macrofage și doar 70% din fierul desfăcut de dextran este utilizat mai rapid în eritropoieză, restul rămâne în macrofage o perioadă lungă de timp, deși anemia feriprivă poate persista (50, 62, 68). Se administrează în doze de 100 mg fier elemental, adică 2 ml de soluție i.m. sau i.v. pe zi (62). Administrarea i.m. se face profund intramuscular, de preferință cu un ac foarte lung, după care locul injecției se masează aproximativ 30 minute.

Pentru a testa sensibilitatea, se recomandă ca doza inițială să fie de 0,5 ml (2).

Administrarea i.v. este o cale mai puțin utilizată și legată de un risc mai mare de reacție anafilactică (3). De aceea mulți autori recomandă renunțarea la această cale. Dacă totuși ea este necesară, se testează sensibilitatea cu o soluție de 5 ml fier-dextran în 100 ml ser fiziologic, într-un ritm de 20 picături pe minut, timp de 5 minute, și dacă nu apar fenomene de hipersensibilitate se continuă cu 40—60 de picături pe minut. Administrarea i.v. necesită măsuri de precauție: se va avea la îndemână epinefrină, cortizon și acces rapid într-un serviciu de reanimare (2, 3).

Fier-dextranul administrat i.v. este de asemenea desfăcut în macrofage, iar fierul este cedat transferinei (68).

În primele 3 săptămâni, 30—50% din fierul injectat este utilizat în sinteza hemoglobinei (68).

Doza necesară de fier pe cale parenterală se calculează după formula:

$$\text{Fier injectat i.m. sau i.v. (mg)} = (15 - \text{Hb bolnavului în g/dl}) \times \text{greutatea corpului} \times 3.$$

De exemplu, un bolnav cu 70 kg greutate care are o anemie cu 7 g Hb va necesita: (15—7)×70×3=1 680 mg fier pentru corectarea anemiei, la care se va adăuga o cantitate de 1 000—1 200 mg pentru bărbat și 800—1 000 mg pentru femei, cantitatea necesară depozitelor. O altă formulă ar fi următoarea: pentru fiecare gram de Hb lipsă se injectează 0,225 g fier, deci pentru cazul expus mai sus 8×0,225=1 800 mg plus fierul pentru depozite (127).

Reacții adverse. Pe cale i.m., administrarea de fier-dextran poate induce o durere la locul injecției și o colorare brună a tegumentelor. Uneori apare și o adenopatie regională (3). În administrarea i.v. cu glucoză poate apărea o flebită, care poate fi evitată, dacă se folosește pentru diluare o soluție de ser fiziologic sau dacă se injectează chiar nediluat foarte lent. La 30% din bolnavi apar artralgii (61, 127). Alte reacții adverse ce pot apărea sunt: hipotensiune, bradicardie, mialgii, cefalee, durere abdominală, greață, vărsături, ameteli, revărsat pleural, reacții alergice, stare febrilă (ce poate dura până la 10 zile), leucocitoză, creșterea VSH. O colorație cenușie a tegumentelor a fost observată după administrarea dozei totale ca doză unică. Acest procedeu, propus de unii cercetători, nu este admis în multe țări (SUA etc.).

Uneori apar reacții meningeale. La bolnavii cu artrită reumatoidă sau spondilită anchilopoietică s-a menționat exacerbarea durerilor articulare (3).

La șobolani, administrarea i.m. de fier-dextran a dus, într-un procent relativ crescut, la apariția de fibrosarcom local. O descriere similară s-a făcut și la oameni cu tratamente repetate i.m. (50).

Cea mai severă reacție adversă este șocul anafilactic, ce apare la 1% din bolnavii tratați cu fier-dextran i.m. sau i.v. El poate apărea chiar după injectarea de câteva picături i.v. sau i.m., nefiind legat de doză (2, 3).

Șocul anafilactic poate fi urmat de infarct și/sau hemoragie cerebrală. Se menționează că preparatele cu fier bivalent sunt ușor disociabile și pot induce ușor hipotensiune (2, 3).

Se folosește, pentru prevenirea șocului anafilactic, administrarea de metilprednisolon, difenhidramin, efedrină. Administrarea de fier parenteral este total contraindicată dacă a provocat anterior o reacție anafilactică (2).

Răspunsul la terapia cu fier (31, 79, 90). În general, în câteva zile dispar cefaleea, oboseala, parestezиile etc. Pica dispare în 7 zile. Reticulocitele cresc în 3—4 zile după administrarea i.v. sau i.m. și în 7—12 zile după cea perorală. Hemoglobina crește în 3—5 săptămâni cu 50% față de valoarea inițială. Un nivel normal de Hb este atins abia după 2 luni, indiferent de modul de administrare — peroral sau parenteral. Pe măsură ce crește concentrația de Hb în sânge, scade microcitoza și hipocromia.

După 1—2 săptămâni se regenerează papilele linguale, iar în 3 luni dispare atrofia mucoaselor digestive. Koilonichia dispare în 3—6 luni. Gastrita la vârstnici poate persista. Cel mai puțin influențată este disfagia.

Administrarea de fier se continuă chiar dacă cifra de Hb a revenit la valori normale, în vederea refacerii depozitelor de fier. Pe cale orală,

se administrează fier încă o perioadă de timp echivalentă de obicei celei care a dus la normalizarea cifrei de Hb (2—4 luni şi mai mult, în funcţie de gradul anemiei). Când anemia se datoreşte unor boli ca hernia hiatală, telangiectazia ereditară, menoragii funcţionale, în care sângerarea cronică este evidentă şi fără soluţie chirurgicală, administrarea de fier peroral va fi indefinită. Acelaşi mod de tratament indefinit cu preparate de fier se aplică şi la bolnavii cu hemoliză cronică intravasculară (cei cu proteze valvulare, vasculare etc.) (70, 90).

Există situaţii când terapia marţială este ineficientă: diagnostic eronat al tipului de anemie, asocierea de boli inflamatorii, neoplazice, boli de ficat, deficit de vitamină B_{12}, acid folic, hipotiroidie — în care fierul nu este folosit pentru eritropoieză sau este folosit parţial (127). O altă cauză de eşec a terapiei marţiale este totala necooperare a bolnavului.

Administrarea profilactică de fier este indicată în sarcină (în a 2-a jumătate), la bolnavi gastrectomizaţi, donatori de sânge, sugari (1, 70, 90). La gravide se administrează cel puţin o cantitate de fier de 7—30 mg/zi, iar la sugar 1 mg/kg corp/zi. Donatorii de sânge primesc pentru fiecare flacon de 250 ml, 1 000 mg fier elemental pentru bărbaţi şi 2 000 mg pentru femei, ţinându-se cont că la un subiect neanemic absorbţia intestinală a fierului este de 10% din fierul introdus peroral. (În 250 ml sânge se găsesc 125 mg fier, deci dacă se administrează 1 000 mg fier, se absorb practic 100 mg) (62, 70, 90).

Intoxicaţia acută cu fier (123) este relativ frecventă mai ales la copii, care accidental ingeră preparate (tablete) de fier în cantitate mare.

Prima manifestare a intoxicaţiei este voma ce apare la o oră de la ingestie. Urmează hematemeză, melenă, agitaţie, hipotensiune, tahipnee, cianoză. După câteva ore se instalează coma ce poate deveni ireversibilă.

Tratamentul constă în eliminarea imediată a conţinutului gastric fie prin stimularea faringelui, fie printr-un tub adecvat după care se administrează peroral o soluţie călduţă de bicarbonat de sodiu de 4 g/100 ml. Această soluţie favorizează atât fixarea fierului, cât şi provocarea de vărsături. Se administrează apoi pe tub o soluţie cu 3—5—10 g de desferioxamină sau deferoxamină (Desferal) în 50—100 ml apă distilată, agent chelant activ al fierului. Tratamentul se continuă cu administrarea de Desferal, 1 g i.m. în doză iniţială, urmat de injectarea de 0,5 g la 4—8 ore şi apoi de 0,5 g la 12 ore, în funcţie de starea clinică (51, 123, 127).

Administrarea Desferalului se poate face şi i.v. în doze maxime de 15 mg/kg corp şi pe oră, pentru a evita hipotensiunea pe care o poate induce medicamentul; în această situaţie, administrarea se face în soluţie de glucoză 5% (1 000 ml), iar concentraţia de Desferal va fi de 0,01%. Doza iniţială va fi de asemenea de maximum 1 g urmată de repetarea acestei doze sau de 0,5 g la 4—12 ore, în funcţie de starea clinică. Acest procedeu se aplică îndeosebi la copii (51, 123).

În toate cazurile se vor lua măsuri adecvate de combatere a şocului şi a acidozei metabolice.

În lipsa Desferalului se poate folosi EDTA 80 mg/kg şi zi. Administrarea EDTA trebuie să fie de asemenea foarte lentă, datorită efectelor sale nefrotoxice bine cunoscute (127).

Ameliorarea stării generale are loc după câteva ore sau zile de la începerea tratamentului. Ameliorarea poate fi însă înşelătoare, deoarece între timp se poate instala o pneumonită cu fier, insuficienţă hepatică acută, tulburări neurologice grave etc. Treptat se instalează convulsiile, coma, icterul.

Copiii care supravieţuiesc 3—4 zile se pot reface fără sechele. Complicaţiile tardive sunt stenozele gastrice sau intestinale (128).

B. ALTE ANEMII HIPOCROME INDUSE PRIN TULBURĂRI ÎN METABOLISMUL FIERULUI

(repartiţia anormală a fierului în compartimentele sale fiziologice)

În prima parte a acestui mare grup de anemii hipocrome, provocate de tulburări în metabolismul fierului, a fost prezentată scăderea cantităţii totale a fierului din organism, stare denumită curent *„deficitul de fier"*.

În capitolul acesta vor fi expuse alte tulburări în metabolismul fierului în care reducerea aportului de fier la măduva osoasă nu mai este indusă de carenţa sau deficitul de fier, ci de o *„repartiţie anormală a fierului în sectoarele sale fiziologice"*. Se înţelege deci chiar din definiţie că între aceste două grupe există o diferenţă fundamentală, şi anume: *scăderea cantităţii totale de fier în deficitul de fier* şi o *cantitate normală sau crescută de fier în cel de-al doilea grup.*

Această distincţie are şi o valoare practică deosebită atât în stabilirea diagnosticului, cât mai ales în terapie.

În acest capitol vor fi discutate: 1. *anomalii în transportul fierului* cum sunt atransferinemiile, carenţa de cupru; 2. *anomalii în utilizarea fierului la nivelul membranei eritroblaştilor, ca în sindromul Shahidi—Nathan—Diamond; 3. anomalii în depozitarea fierului,* ca anemia din bolile cronice şi hemosideroza pulmonară.

1. TULBURĂRI ÎN TRANSPORTUL FIERULUI ATRANSFERINEMII

ATRANSFERINEMIA CONGENITALĂ

A fost descrisă de Heilmeyer, în 1961, ca o anemie severă hipocromă, la bolnavi în a căror plasmă nu s-a putut determina transferina (12, 53). O boală asemănătoare a fost descrisă la o suşă de şoareci pură (49, 60).

Modul de transmitere a bolii este autosomal recesiv. Cantităţi de transferină reduse până la 50% din valorile normale au fost decelate la părinţii şi rudele bolnavilor. Unele rude aveau chiar o anemie hipocromă moderată (53, 60).

Tabloul clinic este dominat de oboseală, paloare, hepatomegalie. Bolnava descrisă de Heilmeyer a sfârşit cu hemocromatoză prin insuficienţă cardiacă (12, 49); în măduva osoasă hemosiderina era absentă deşi i se

administrase cantități importante de sânge. Fierul era însă mult crescut în ficat.

Examene de laborator. Anemia prezintă grade variate (3,2—9 g/dl), concentrația fierului seric este foarte joasă (~ 20 μg/dl), iar capacitatea totală de fixare a fierului este mult redusă (prin reducerea transferinei), în jur de 50 μg/dl. Transferina circulantă este subnormală și în atransferinemie congenitală este între 0 și 39 μg/dl. Determinarea se face prin imunodifuzie radială. Defectul genetic constă în scăderea producției de transferină sau într-o distrugere exagerată datorită instabilității sale structurale (49, 53, 60).

Absorbția fierului la nivelul celulei intestinale apare normală sau chiar crescută, cu un *clearance* ușor accelerat și cu o încorporare eritrocitară de Fe^{59} de 7—50%, deci foarte mult redusă. Cantitatea de fier absorbită, cât este transportată de transferina circulantă, ajunge și se depune în macrofagele ficatului (53). Aportul de fier la eritroblaștii medulari este mult subnormal, mai redus chiar decât în anemia feriprivă, ceea ce explică reducerea marcată a sintezei Hb și absența totală a hemosiderinei medulare. În schimb, cantitatea totală de fier a organismului crește (49, 53) excesiv, până la tabloul final de hemocromatoză, prin depunerea masivă de fier, mai ales în ficat (12, 49, 53).

Diagnosticul diferențial cu celelalte anemii hipocrome este relativ ușor dacă se ține cont de reducerea impresionantă a capacității totale de fixare a fierului, neîntâlnită în nici o altă anemie hipocromă. Dozarea transferinei circulante este decisivă.

ATRANSFERINEMII SECUNDARE

Au fost descrise în *sindromul nefrotic* datorită proteinuriei, uneori abundente (12). O altă formă dobândită a fost descrisă în *eritroleucemie*, asociată cu persistența HbF (prezență posibilă de altfel în eritroleucemie) (12).

În sfârșit, o hipotransferinemie a fost descrisă în *infecții* urinare cronice. În situațiile menționate, tabloul clinic era de hemocromatoză cu anemie hipocromă microcitară și absența fierului medular (12).

Este de asemenea de menționat posibilitatea unei anomalii funcționale a transferinei, indusă prin complexe imune IgG legate de transferină (125). În aceste situații *„transferina anormală funcțional"* poate lega fierul, deci concentrația serică a fierului este normală sau crescută (invers decât în celelalte tipuri menționate), însă nu are capacitatea de a se lega de receptorii pentru transferină, de pe membrana eritroblaștilor, ceea ce duce la o anemie microcitară hipocromă. Tabloul clinic se completează prin prezența hemocromatozei (60).

Tratament. Se utilizează fie plasma proaspătă care are cantități suficiente de transferină, sau chiar transferină purificată (111). Administrarea de plasmă sau de transferină este urmată de o criză reticulocitară la 10—14 zile și de o creștere ulterioară a hemoglobinei. Concentrația de transferină adecvată necesităților de sinteză a Hb se menține însă doar 7—10 zile, fapt ce impune un tratament cronic grevat de impedimentele administrării de plasmă sau proteine de orice fel (111).

Transferina purificată se administrează în doze de 1—2 g la 3—4 luni, pentru perioade de 4—7 ani, fără apariția de anticorpi antitransferină. Administrarea ei este foarte utilă, nu numai pentru rezultatele obținute ci și datorită reducerii riscului de infecție cu virusul hepatitei sau cu HIV ca și micșorării necesității de transfuzii de sânge, ceea ce diminuează constituirea hemocromatozei (19, 51, 111).

ANEMIA PRIN DEFICIT DE CUPRU

Cuprul este un element prezent în unele metaloenzime. Printre cuproenzime sunt menționate citocromul c, citocromoxidaza, dopaminbetahidroxilaza, oxidaza acidului ascorbic, superoxid dismutaza.

Cuprul este transportat în plasmă de ceruloplasmină, o α_2-globulină cu o activitate feroxidazică. Cuprul cu această activitate de feroxidază are o proprietate esențială în activitatea transferinei: el convertește fierul în fier trivalent și îl menține legat de transferină. În acest mod cuprul ia parte indirect în mecanismul de transport al fierului.

Deficitul de cupru a fost descris inițial la porcine și din cauza defectului în transportul fierului, anemia rezultată era hipocromă și microcitară cu hiposideremie, la care se adăugau tulburări severe în structura și funcțiile țesutului conjunctiv, cum ar fi fragmentarea țesutului elastic al vaselor cu consecințele respective (rupere de miocrad, anevrisme) (41, 127).

Deficitul de cupru se întâlnește și la copiii cu malnutriție și la adulții supuși unei îndelungate alimentații parenterale (67).

Tabloul hematologic este de anemie microcitară, hipocromă, cu hiposideremie și precursori eritroblastici în măduvă cu vacuole în citoplasmă. Anemia nu este influențată de terapia cu fier (127).

Acestui tablou i se adaugă pe plan clinic osteoporoza, fracturi de corpi vertebrali și leziuni similare celor din scorbut (127).

Diagnosticul se stabilește prin dozarea ceruloplasminei și a cuprului sanguin, care au valori subnormale.

La adult cuprul seric are valori peste 70 μg/dl. La copii valorile sunt de 40 μg/dl, iar pentru ceruloplasmină sub 12 mg/dl.

Deficitul de cupru a mai fost semnalat și în enteropatii exsudative, nefroză și boala Wilson. Pe lângă anemie și tulburările osoase menționate, deficitul de cupru se însoțește frecvent și de neutropenie (57, 101).

Tratamentul constă în administrarea de 0,2 mg săruri de cupru/kg corp, care este urmată de reticulocitoză promptă și creșterea neutrofilelor. Se administrează de obicei preparate de sulfat de cupru (soluție) ce conțin 25 mg cupru/ml (127).

2. TULBURĂRI ÎN UTILIZAREA FIERULUI LA NIVELUL MEMBRANEI ERITROBLAȘTILOR

SINDROMUL SHAHIDI—NATHAN—DIAMOND

Transferina legată de fier ajunge la nivelul eritroblaștilor medulari unde se fixează pe receptorii specifici pentru transferină, care au o structură de glicoproteină (127).

Fixarea lor este urmată de endocitoza complexului receptor-transferină cu fier și formarea de vezicule care fuzează cu endosomii, unde are loc acidifierea și eliberarea fierului din transferină la membrana externă a mitocondriei.

O tulburare genetică poate reduce mult sinteza acestor glicoproteine și implicit a receptorilor pentru transferină. Consecința este *blocarea trecerii fierului* prin membrana eritroblastică, iar aportul redus de fier la mitocondrie are ca urmare o anemie microcitară hipocromă cu creșterea hemosiderinei medulare și supraîncărcare a depozitelor de fier (127).

Boala congenitală a fost descrisă de Shahidi—Nathan—Diamond și poartă acest nume.

O formă dobândită a acestui sindrom a fost descrisă ca o anemie hipocromă microcitară cu hipersideremie, în care în serul bolnavului s-a depistat un anticorp IgM care precipita receptorii transferinei din membranele eritroblaștilor solubilizate și marcate cu metionin S^{35}. Aceasta a fost dovada unei boli autoimune, antireceptor de transferină, cu consecințele respective în metabolismul fierului. Tratamentul se face cu preparate imunosupresoare (azathioprin) (127).

3. ANOMALII ÎN DEPOZITAREA FIERULUI

ANEMIA DIN BOLILE CRONICE

Se caracterizează printr-o scădere moderată a cifrei de hemoglobină, caracter moderat hipocrom (de obicei normocrom, normocitar) cu scăderea concentrației de fier seric, dar și a capacității totale de fixare a fierului (spre deosebire de anemia feriprivă) cu scăderea sideroblaștilor medulari și cu o depunere marcată de fier în macrofage (76, 87). Acest tip de anemie este comun bolilor infecțioase (tuberculoză, sifilis, febra tifoidă, pneumonie), unor boli inflamatorii (artrita reumatoidă, LED etc.), ca și unor boli neoplazice (boala Hodgkin, cancere de organ etc.). Ea trece de obicei neobservată, fiind considerată o trăsătură obișnuită în bolile susmenționate (38, 59, 78, 79).

Incidență. Frecvența anemiei din bolile cronice infecțioase a fost redusă semnificativ în ultimele decenii prin introducerea terapiei cu antibiotice. Totuși, observații mai vechi o relatează ca fiind frecventă în infecțiile cronice pulmonare, endocardita subacută, inflamații pelviene, osteomielită, infecții fungice. Severitatea anemiei este direct proporțională cu severitatea simptomelor bolii de bază, ca: febră, pierderea ponderală etc. Sunt necesare 1—2 luni de infecție până la apariția anemiei (38, 59, 78, 79).

Anemia hipocromă și microcitară este întâlnită în 23—50% din infecțiile cronice, în 50—100% din inflamațiile cronice și în 44—66% din neoplazii (71, 79, 99).

În inflamații cronice, cum sunt artrita reumatoidă, LED, în arsuri grave, traume severe, infarct miocardic, anemia este mai importantă deoarece inflamațiile cronice dispun de mijloace terapeutice mai puțin eficace (38, 59, 119).

În boli maligne (metastaze carcinomatoase, boala Hodgkin, leucemii etc.) anemia se corelează cu extinderea bolii de bază și se modifică în urma tratamentului acesteia (38, 44, 59).

Tabloul clinic este dominat de tulburările afecțiunii de bază. În condiții fiziologice o reducere a cantității de Hb în jur de 8—10 g Hb/dl nu produce o simptomatologie importantă. Totuși febra, debilitatea fizică, reducerea capacității de transport a oxigenului pot agrava simptomele preexistente (38, 44, 59).

Examene de laborator. Anemia este de obicei descrisă ca normocromă, normocitară, dar adesea și moderat hipocromă (cu hipocromie parțială) sau chiar hipocromă și microcitară.

Reticulocitele sunt în număr normal sau ușor crescut. Modificările numărului de leucocite și trombocite depind de boala de bază.

Ceea ce caracterizează, din punct de vedere biochimic, acest tip de anemie este reducerea concentrației fierului seric, cu o scădere moderată a capacității de fixare a fierului, datorită scăderii moderate a concentrației transferinei circulante (87).

Saturarea cu fier a transferinei este redusă, dar de obicei peste 16%, cum este în anemia feriprivă, ceea ce face ca aportul de fier la măduva osoasă să fie redus, dar gradul anemiei să fie ceva mai moderat (87).

Feritina serică, indicatorul cel mai sensibil al depozitelor de fier este crescută, invers decât în anemia feriprivă (26, 121); o corecție este însă necesară, și anume că în bolile cronice, mai ales inflamatorii, concentrația feritinei poate crește; de aceea o concentrație de feritină peste 60 μg/l ar putea reflecta o creștere a depozitelor de fier în aceste boli (15, 26, 76, 121).

Măduva osoasă poate fi modificată frecvent de boala de bază. În general, celularitatea este normală cu o hiperplazie eritroidă moderată. Sideroblaștii sunt în număr scăzut, în schimb se constată o creștere remarcabilă a numărului de macrofage încărcate cu fier, care este markerul citologic al acestui tip de anemie.

Durata de viață a eritrocitelor este moderat scăzută, cu 20—30% față de durata normală, prin defect extracorpuscular.

Datele de ferokinetică indică o producție eritrocitară normală sau ușor crescută, turnoverul Fe^{59} este normal sau moderat accelerat, iar utilizarea Fe^{59} este de 70%, la limita inferioară sau uneori sub limita inferioară a valorilor normale de 80—100%, ceea ce indică o ineficiență moderată a eritropoiezei (97).

Patogenie. În linii generale se consideră că anemia din bolile cronice este o parte a „sindromului de stres hematologic", indus prin activarea macrofagelor și limfocitelor ca răspuns la infecție, inflamație și malignitate. Activarea se materializează prin sechestrarea excesivă a fierului în macrofage, creșterea distrugerii eritrocitelor în splină și diminuarea activității celulelor stem eritroide. Tot afecțiunea de bază (infecția, inflamația etc.) scade activitatea limfocitelor T_4, activitatea tiroidei și a producției de eritropoietină (15, 29, 84).

Modificările metabolismului fierului. Absorbția intestinală a fierului este ușor redusă și defectul constă mai ales în eliberarea fierului încor-

porat în celula intestinală către transferină, proces ce seamănă cu sechestrarea fierului în macrofage și în celulele hepatice (15, 87, 121).

Blocajul monocitomacrofagic al fierului a fost demonstrat experimental la animale, la care după producerea de abcese sterile, fierul marcat din eritrocitele distruse nu mai era reutilizat în eritropoieză (15, 87, 104). Același blocaj al reutilizării fierului din macrofage a fost demonstrat la bolnavii cu infecții cronice, cancer, boală Hodgkin și artrită reumatoidă; el apare în toate infecțiile și inflamațiile după administrarea de pirogen, sau la 24 de ore după o intervenție chirurgicală (15, 76, 87, 104). Mecanismul acestui blocaj nu este încă elucidat. S-a presupus că producția crescută de interleukină-1 (IL-1) stimulează sinteza de cantități mari de apoferitină în macrofage, care sechestrează fierul. Cercetări mai noi au subliniat rolul lactoferinei care, în boli inflamatorii, este sintetizată în exces. Lactoferina din macrofage este în competiție cu apotransferina și apoferitina în captarea fierului din eritrocitele distruse în macrofage; dată fiind marea sa afinitate pentru fier, o mare parte a acestuia este fixată de lactoferină și blocată în macrofage, devenind practic inutilizabilă pentru eritropoieză (15, 76, 87, 104).

Pe lângă blocarea fierului în macrofage, anemia din bolile cronice se mai caracterizează prin scăderea concentrației de transferină circulantă, responsabilă de scăderea capacității de fixare a fierului. Pe lângă o reducere a producției de transferină s-a mai constatat și o creștere a receptorilor pentru transferină pe suprafața macrofagelor, deci o cantitate importantă de transferină este dirijată, captată și metabolizată în macrofage (87, 104).

Saturarea cu fier a transferinei circulante este ceva mai ridicată decât în anemia feriprivă, ceea ce explică și gradul mai redus de obicei al anemiei în bolile cronice, printr-un aport mai mare de fier la măduva osoasă (15, 87, 104).

Proliferarea celulelor stem eritroide. Celulele stem eritroide au o capacitate mare de a compensa rapid orice scurtare a duratei de viață a eritrocitelor, dacă există stimulii adecvați, cum este, de exemplu, eritropoietina etc. (14, 25).

În anemia din bolile cronice eliberarea de eritropoietină ca și răspunsul la eritropoietină sunt mai reduse decât la normali.

Cercetări experimentale, care au folosit cocultura de celule eritroide normale cu celule macrofage de la bolnavii cu inflamație cronică sau boli maligne, au demonstrat clar scăderea proliferării celulelor eritroide progenitoare normale (129).

În LED, artrita reumatoidă, s-a constatat că limfocitele activate eliberează inhibitori circulanți, cu efect negativ asupra creșterii celulelor progenitoare eritroide (84). Printre aceștia au fost identificați prostaglandinele, acidul izoferitin, interferonii și factorul tumoral de necroză (84, 108). Acești factori au însă efect inhibitor pe toate seriile, astfel că, un factor specific pe seria eritroidă nu a putut fi încă izolat. Proliferarea redusă a măduvei osoase este certă și este un factor ce contribuie esențial în patogeneza anemiei care, după cum s-a constatat din cele expuse, este complexă: pe lângă blocarea fierului în macrofage, cu scăderea aportului de fier la măduvă și deci a sintezei de hemoglobină, se adaugă defectul

medular în proliferare și scurtarea duratei de viață a eritrocitelor (mecanism hemolitic) (127).

Diagnosticul pozitiv se bazează pe datele oferite de examenul clinic și îndeosebi pe existența unei boli cronice, la care se adaugă o anemie hipocromă complexă cu trăsăturile caracteristice expuse mai sus.

Diagnosticul diferențial se face cu următoarele afecțiuni:

— *anemia prin diluție,* semnalată în neoplasme avansate, mielom și boala Waldenström;

— *anemia hemolitică prin medicamente* (fier seric crescut, bilirubină crescută, test Coombs pozitiv);

— *anemia feriprivă* (fierul seric scăzut, creșterea capacității de fixare a fierului, feritina serică scăzută);

— *anemia din bolile renale* (azotemie etc.);

— *anemia ce însoțește metastazele medulare:* fierul seric normal sau crescut, eritrocite în picătură, leucocitoză cu neutrofilie cu deviere la stânga și prezența de eritroblaști în sângele periferic *(anemia mieloftizică).*

Tratament. Anemia din bolile cronice necesită rareori un tratament, deoarece este relativ moderată, cu valori ale Hb între 7 și 11 g/dl, este în general bine tolerată și trece adesea neobservată sau este neglijată, datorită bolii de bază care domină tabloul clinic.

Scăderea moderată a concentrației fierului seric cu o capacitate totală de fixare apropiată de valori normale nu este, pe de altă parte, dăunătoare activității medulare.

Problema devine mai importantă când anemia este mai severă și o creștere a Hb este benefică pentru un suferind cronic. În principiu, nu se administrează fier peroral și nici parenteral. Ameliorarea prin feroterapie observată în unele cazuri, sugerează asocierea cu o carență de fier.

Se utilizează, fără efecte spectaculare, clorura de cobalt și hormonii androgeni. Transfuziile de masă eritrocitară se aplică după necesități, cu riscurile bine cunoscute (86).

Mai recent s-a introdus în practica clinică eritropoietina (recombinată) care în anemia din insuficiența renală cronică a dat rezultate apreciabile (7, 17, 18, 27).

Datele din literatură confirmă efectul favorabil al administrării periodice de eritropoietină prin menținerea unui nivel convenabil a Hb și fără efecte secundare (7, 17, 18, 27, 92).

HEMOSIDEROZA PULMONARĂ IDIOPATICĂ

Este o boală caracterizată prin hemoragii intraalveolare cu blocare de fier în macrofagele pulmonare și anemie hipocromă microcitară severă. Boala este întâlnită aproape exclusiv la copii și adulții tineri și are o incidență de 0,24 cazuri la un milion. Au fost descrise câteva cazuri la mamă și fiu (transmisie prin cromosomul X).

Etiologie—patogenie. Cauza acestei boli cu evoluție uneori foarte severă nu este încă bine cunoscută. S-a sugerat alergia la unele substanțe

nespecifice după ingestia de lapte de vacă. Alte date sugerează un mecanism autoimun, cu formarea de epiteliu pulmonar anormal sau anomalii ale fibrelor elastice (20, 22). Mecanismul autoimun a fost sugerat și de apariția hemosiderozei pulmonare, uneori înainte de instalarea unui LED, PTI cronic sau a unei artrite reumatoide (20). În alte cazuri s-a întâlnit o asociere cu boala celiacă sau enteropatia glutenică. Hemosideroza pulmonară poate preceda sau/și se poate asocia cu un sindrom Goodpasture (221).

Au mai fost de asemenea descrise depuneri de complexe imune pe membrana bazală glomerulară, amiloidoză renală cu sindrom nefrotic, asocierea cu gamapatii monoclonale IgA (22).

Substratul tabloului clinic, cu toate tulburările descrise, este constituit de hemoragiile intrapulmonare cu apariția de macrofage încărcate cu fier în plămân. Fierul din aceste depozite nu este folosit în eritropoieză și este parțial eliminat prin spută.

Morfopatologie. În plămân se constată degenerarea, hiperplazia și descuamarea celulelor epiteliale ale alveolelor pulmonare asociată cu o dilatare și proliferare capilară, vasculită și tromboză. Degenerarea fibrelor elastice alveolare și interstițiale, scleroza vaselor pulmonare, hipertrofia musculară a arteriolelor bronșice și prezența de membrane hialine sunt alte modificări observate, fără a fi însă specifice, deoarece sunt întâlnite și în alte boli, însoțite de hemoptizii (30).

Examenele electronooptice au arătat umflarea și vacuolizarea endoteliului capilar alveolar, îngroșarea focală și fragmentarea membranei bazale cu depunerea de material fibrilar între fragmentele ei (30). În zonele afectate se observă o hiperplazie a celulelor alveolare. Lisosomii și mitocondriile acestor celule sunt încărcate cu fier. Deși măduva osoasă nu conține fier, în ficat și splină s-au descris depuneri importante de fier, astfel încât cantitatea totală de fier a organismului este crescută (30).

Leziuni glomerulare renale au fost semnalate uneori precoce încât diferențierea de un sindrom Goodpasture este uneori dificilă.

Tabloul clinic. Pe lângă o anemie feriprivă cu semnele de deficit de fier se observă tuse, pierdere ponderală, oboseală. Tusea se însoțește de hemoptizii, uneori abundente sau alteori reprezentate prin existența unor fire de sânge în spută. Uneori hemoptizia poate fi chiar absentă.

Treptat se instalează semne de disfuncție pulmonară cu dispnee, modificarea extremităților degetelor, hipertensiunea arterială pulmonară și insuficiență cardiacă (5, 20).

Examenele hematologice de laborator sunt similare celor din anemia feriprivă hipocromă, cu microcitoză eritrocitară, scăderea importantă a concentrației fierului sanguin și creșterea capacității de fixare a fierului. Bilirubina poate fi crescută, urobilinogenul de asemenea ușor crescut. Reticulocitele sunt în număr crescut, în special după hemoptizii mai mari. În măduvă seria roșie este mult crescută. La unii copii bolnavi s-au descris anticorpi la lapte bovin. Anticorpi pentru membrana bazală glomerulară au fost detectați ocazional în cazurile cu hematurie microscopică (5, 20, 127).

Un semn deosebit de important pentru diagnosticul pozitiv este existența de macrofage încărcate cu fier în sputa bolnavilor fără hemoptizie (127), în care se mai găsesc și numeroase epitelii alveolare descuamate, ce conțin abundent pigment feric pus în evidență prin colorație cu albastru de Berlin (celule cardiace).

Explorarea funcțională pulmonară arată reducerea capacității vitale, a capacității maxime respiratorii, ca și a difuziei de oxigen. Cateterismul cardiac pune în evidență o hipertensiune pulmonară marcată.

În faza activă a bolii, examenul radiologic pulmonar arată existența în câmpurile mijlocii și inferioare a unor infiltrate cu contur estompat, provocate de prezența sângelui în alveole (127, 128).

Infiltratele pulmonare dispar însă rapid. Evoluția progresivă a bolii se manifestă radiologic prin punctarea miliară a plămânului și fibroză perihilară. Uneori examenul radiologic pulmonar arată aspecte similare pneumonitei tuberculoase, infecției cu *pneumocystis carini* sau cu micoplasma etc.

Administrarea de Fe^{59} sau Cr^{51} arată acumularea acestor trasori în leziunile pulmonare.

Diagnosticul pozitiv se bazează pe cele două manifestări importante ale bolii: anemia cu caracter hipocrom, microcitar, feripriv și tulburările pulmonare.

Diagnosticul diferențial impune deosebirea, în faze incipiente de sindromul Goodpasture, în care glomerulonefrita cronică se asociază cu hemosideroză pulmonară.

Sindromul Goodpasture se manifestă la tineri de sex masculin. Hemoptizia este rareori masivă. Spre deosebire de hemosideroza pulmonară, sindromul Goodpasture este marcat de evoluția precoce și progresivă a glomerulonefritei cronice, ce are drept mecanism patogenic depunerea de anticorpi anticolagen pe membrana bazală glomerulară și a alveolelor pulmonare, ceea ce explică semnele clinice (126). Azotemia apare precoce și este ireversibilă. A fost descrisă și o formă acută ce începe cu manifestările renale și are o evoluție rapidă, nedepășind decât în puține cazuri durata de un an.

Multe din aspectele radiologice pulmonare și histopatologice ale hemosiderozei pulmonare sunt comune cu cele din sindromul Goodpasture, ceea ce a făcut pe mulți cercetători să le considere expresii oarecum diferite ale unei singure boli. Plecând de la aceste constatări s-a recomandat ca în hemosideroza pulmonară să se efectueze o *biopsie* renală, pentru a decela leziuni glomerulare incipiente și a se începe un tratament imunosupresor precoce pentru evitarea insuficienței renale cronice rapid progresive și grave (126).

În acest sens, studiile efectuate au arătat că în unele cazuri de hemosideroză pulmonară, fără prezența de manifestări renale, biopsia renală a detectat depuneri mezangiale de imunoglobuline IgG, IgA și de C_3, aspect denumit „nefropatie IgA", posibil un aspect precoce al sindromului Goodpasture (126).

Evoluția este variabilă. S-au descris remisiuni de lungă durată, deși unele observații arată că sângerarea poate continua și în timpul remisiunii clinice. Complicațiile frecvente sunt insuficiența cardiacă, hemoragia masivă cu inundare pulmonară, miocardita. Sarcina poate agrava evoluția hemosiderozei.

Tratament. Terapia marțială corectează anemia și se completează de obicei cu o terapie imunosupresoare (ciclofosfamidă, azatioprin și corticoterapie). Inhalațiile cu corticosteroizi în spray ameliorează tulburările pulmonare.

Depistarea unor anticorpi circulanți, de tipul celor menționați mai sus, sugerează utilizarea, când titrul lor este ridicat, a plasmaferezei pe lângă terapia imunosupresoare (105).

În situații particulare, la copii, de asociere cu boala sau enteropatia celiacă, se evită glutenul. Dacă laptele de vacă se dovedește a fi incriminat, el va fi exclus din alimentație.

Deoarece boala are de obicei remisiuni spontane, rezultatele terapeutice sunt greu de apreciat.

ANEMII SIDEROBLASTICE

(anemii hipocrome prin deficit în sinteza protoporfirinei, anemii sideroacrestice, anemii hipocrome hipersideremice)

Definiție. Caracteristici și considerații generale. Anemiile sideroblastice sunt un grup heterogen de afecțiuni, moștenite sau dobândite, caracterizate prin prezența de „sideroblaști inelari" în măduva osoasă, hipersideremie, saturație crescută a transferinei, microcitoză și hipocromie. Sideroblaștii inelari (fig. XXI.8 și fig. XXI.9) sunt considerați patologici și se caracterizează prin depunerea de fier micelial în mitocondrii (127).

Fig. XXI.8. — Sideroblaști inelari în anemia refractară sideroblastică idiopatică.

Fig. XXI.9. — Mitocondrie cu micelii feruginoase în anemia sideroblastică ereditară.

Din cauza distribuției perinucleare a mitocondriilor, la colorația cu albastru de Prusia, ele apar ca un inel în jurul nucleului (127, 128).

Excesul de fier mitocondrial este o consecință a tulburării blocării sintezei hemului la diferitele niveluri (63). Faza finală a sintezei hemului are loc în mitocondrie prin legarea protoporfirinei de fier; în anemiile sideroblastice sinteza protoporfirinei este deficitară, motiv pentru care fierul rămas liber se acumulează în mitocondriile eritroblaștilor, în macrofage sau în alte țesuturi (sideroză) (63). Sideroza mai este accentuată și de faptul că în pofida supraîncărcării cu fier a organismului, fierul se absoarbe normal sau chiar în cantități crescute la nivelul tubului digestiv (5). În stadii înaintate, sideroza duce la hemocromatoză (5).

Pe lângă supraîncărcarea cu fier a organismului, anemiile sideroblastice se mai caracterizează morfologic prin prezența de eritrocite microcitare și hipocrome, consecință de asemenea a sintezei deficitare a hemului. Alteori tabloul morfologic arată un dimorfism eritrocitar, cu eritrocite hipocrome care coexistă cu o populație de eritrocite macrocitare (127).

Eritrocitele hipocrome pot prezenta punctații bazofile.

Studiile de ferokinetică au arătat în marea majoritate a cazurilor un aspect de eritropoieză ineficace cu o reînnoire („turnover") accelerată a fierului plasmatic, necesar sintezei de hemoglobină, ce are loc în masa crescută de normoblaști din măduvă (97). Utilizarea fierului în eritrocite este însă subnormală, deoarece normoblaștii cu depuneri de fier în mitocondrii sunt neviabili, se distrug rapid, *in situ*, prin fenomenul de hemoliză intramedulară și nu mai ajung a da naștere la eritrocite mature (97, 127).

Durata de viață a eritrocitelor este normală.

Caracterele generale morfologice, biochimice și eritroferokinetice ale anemiilor sideroblastice sunt expuse în tabelul 21.XI.

TABELUL 21.XI

Caractere generale ale anemiilor sideroblastice

1. Hipocromie sau/şi dimorfism eritrocitar
2. Reticulocitopenie — punctaţii bazofile
3. Hiperplazie eritroblastică medulară — megaloblastoză
4. Sideroblaşti inelari, hemosiderina medulară în macrofage intens crescută, tendinţă la hemocromatoză
5. Eritropoieză ineficace; hemoliză intramedulară a eritroblaştilor anormali, cu hiperbilirubinemie indirectă şi hiperurobilinogenurie, hipersideremie, *clearance* şi turnover ^{59}Fe plasmatic crescute, încorporare ^{59}Fe în eritrocite subnormală
6. Durata de viaţă a eritrocitelor normală
7. Absenţa unei hemoglobine anormale

Etiologie. Patogenie. Cercetările din ultimele patru decenii privind patogenia anemiilor sideroblastice au fost centrate îndeosebi asupra defectului mitocondrial în sinteza hemului şi mai ales asupra tulburărilor în metabolismul piridoxinei (114).

Numeroase cercetări iniţiate în mod deosebit de către Heilmeyer, urmate de alte studii, au demonstrat deficitul în celulele eritroide a unor enzime necesare sintezei protoporfirinei (52, 75). Astfel deficitul de delta-aminolevulinat sintetază, prima enzimă din calea de biosinteză a hemului, a fost constant depistat în anemiile sideroblastice ereditare (6, 21). De asemenea, mai mult sau mai puţin constant au fost semnalate deficite de uroporfirinogen-decarboxilază, coproporfirinogen-oxidază sau hemsintetază (fier chelatază) (6, 21, 52).

Deficitul de hemsintetază a fost considerat de unii cercetători ca secundar leziunilor mitocondriale prin supraîncărcarea lor cu fier (75). Toate aceste deficite enzimatice au ca efect reducerea sintezei de protoporfirină şi deci de hem, cu depunere de fier în mitocondrii. Concluzia ar fi deci că în formarea sideroblaştilor inelari ar putea fi încriminate mai multe defecte enzimatice (128). S-a pus însă şi problema dacă nu cumva aceste deficite enzimatice ar fi secundare unor leziuni mitocondriale (127, 128).

Deficitele enzimatice menţionate nu pot explica şi alte trăsături, constant întâlnite în aceste anemii (menţionate la caracterele generale), şi anume megaloblastoza, observată în aproape toate tipurile de anemie sideroblastică, diseritropoieza, nivelul scăzut de acid folic sanguin, precum şi unele anomalii metabolice (exemplu metabolismul triptofanului).

De aceea atenţia s-a concentrat asupra piridoxinei, deoarece prin forma sa activă piridoxal 5′-fosfat este coenzima esenţială pentru prima treaptă din sinteza protoporfirinei, şi anume condensarea glicinei şi a succinil-CoA pentru a forma acidul deltaaminolevulinic (114, 127). Totodată el este un factor activ şi pentru conversia serinei în glicină.

Această reacţie generează o formă de folat coenzimă necesară sintezei timidilatului, etapă importantă în sinteza ADN (114). Deficitul formării de piridoxal 5′-fosfat ar putea explica reducerea sintezei protoporfirinei şi ar putea fi responsabil de producerea unor anemii sideroblastice; el ar explica totodată şi tulburările din sinteza ADN care generează devierea megaloblastică, frecvent întâlnită în aceste afecţiuni (114, 127).

Descoperirea unei gene distincte (ALAS 2) ce codează deltaaminolevulinat sintetaza, localizată pe cromosomul X şi exprimată numai în

celulele eritroide, susține ipoteza că defectul responsabil pentru anemia sideroblastică legată de sex (de cromosomul X) interesează gena ce codează izoenzima deltaaminolevulinat sintetazei (30b). Recent, a fost identificată o mutație în gena ALAS 2 la un bolnav cu anemie sideroblastică cu răspuns la piridoxină, având ca rezultat o reducere mare a activității enzimei, corectabilă prin administrarea de piridoxină; această mutație are un caracter familial, fiind găsită și la bolnav și la unii membri ai familiei sale (30a, 30b).

Deficitul de piridoxină indus experimental la porci dă naștere unei forme severe de anemie sideroblastică (microcitară, hipocromă).

Totuși, cercetările efectuate în anemiile sideroblastice la om nu au putut decela niciodată un deficit de piridoxal-fosfat sau o scădere a activității piridoxal kinazei, cu excepția unor forme secundare, cum ar fi cele induse de tuberculostatice sau alte medicamente (91).

Există însă forme de anemii sideroblastice (mai ales congenitale) care răspund la doze mari de piridoxină (48, 58); nivelul sanguin al piridoxinei în aceste forme este normal, dar probabil activitatea sa este mult redusă.

Atât tulburările din sinteza hemului, cât și cele ale metabolismului piridoxinei nu pot explica însă patogenia unor alte forme de anemii sideroblastice, cum ar fi cele idiopatice dobândite, în care, pe lângă anomalii enzimatice, apar modificări de tip clonal ale genomului celular, cu tulburări de creștere și de diferențiere a celulelor stem hematopoietice ce caracterizează bolile mielodisplazice sau stările preleucemice (52, 85, 103).

Din considerațiile de mai sus se pot deduce următoarele concluzii:

1) Anemiile sideroblastice reprezintă un grup heterogen de boli, cu patogenie variată; încadrarea lor ca atare se bazează pe un criteriu convențional unic, și anume prezența sideroblaștilor inelari în măduva osoasă (98, 127, 128).

2) În patogenia acestor boli, pe lângă deficitul de sinteză a protoporfirinei, indus de unele deficite enzimatice, și prezența de anomalii în metabolismul piridoxinei, există și alte mecanisme în care sunt implicate celulele stem hematopoietice (128).

Clasificarea anemiilor sideroblastice se bazează pe criterii patogenetice: 1. anemii sideroblastice ereditare, din care fac parte forma legată de sex și forma autosomală recesivă; 2. anemii sideroblastice dobândite primare idiopatice și *formele secundare* (tabelul 21.XII).

Clasificarea anemiilor sideroblastice TABELUL 21.XII

A. **Anemii sideroblastice ereditare**
1) *Legate de sex* (anomalie pe cromosomul X) sau tip I Heilmeyer
— deficit de deltaaminolevulin sintetază
— deficit de coproporfirinogen oxidază
2) *Autosomal recesive* sau tip II Heilmeyer

B. **Anemii sideroblastice dobândite**
1) Anemia sideroblastică idiopatică dobândită („mielodisplazie")
2) Anemii sideroblastice secundare*
(neoplazii, infecții, inflamații, substanțe toxice)

* A se vedea tabelul 21.XIII.

ANEMIILE SIDEROBLASTICE EREDITARE

ANEMIA EREDITARĂ LEGATĂ DE SEX

Descrisă de Cooley (1945) și Rundles (1946), este cunoscută și sub denumirea de anemia sideroblastică ereditară de tip I Heilmeyer (52). Harris a descris după aproximativ 10 ani anemia cu răspuns la piridoxină ca o formă separată, care de fapt este tot o anemie ereditară sideroblastică care răspundea la terapia cu vitamina B_6 (48).

Boala apare numai la bărbați, ceea ce sugerează o transmitere recesivă legată de cromosomul X. În familiile afectate, numai bărbații homozigoți fac anemie. Totuși la femeile purtătoare s-au întâlnit eritrocite anormale morfologic (hipocrome) similare celor de la bolnavi. Eritrocitele anormale conțin un antigen eritrocitar legat de cromosomul X denumit X_g^a ce reprezintă o dovadă a moștenirii anomaliei prin cromosomul X (127).

Cercetări clinice, efectuate după anul 1946, au identificat o anemie ereditară la femei cu caractere similare anemiei legate de sex, fapt ce a dus la concluzia că există și o formă cu transmitere autosomală recesivă. Aceasta a mai fost denumită și tipul II Heilmeyer (52).

Patogenie. Studiile clinice și cele experimentale au arătat o oarecare asemănare între anemia sideroblastică ereditară și anemia prin deficit de piridoxină indusă experimental la porcine. Totuși există unele diferențe semnificative, și anume lipsa unor dovezi de carență de vitamină B_6 la om, corectarea anemiei ereditare umane necesită doze mari de piridoxină, iar răspunsul este incomplet.

În anemiile sideroblastice ereditare, activitatea deltaaminolevulinat sintetazei (δ-ALS) este redusă la mai puțin de jumătate din valoarea sa normală (21). Administrarea de piridoxină în doze mari sau de piridoxal-fosfat, determină o revenire la normal a activității deltaaminolevulin sintetazei, iar întreruperea administrării de piridoxină o readuce la nivelul inițial diminuat (21, 52, 114).

Studiile efectuate sugerează 3 anomalii posibile ale activității δ-AL sintetazei (6, 52, 120): a) afinitate redusă pentru piridoxal-fosfat; b) sensibilitatea crescută a apoenzimei la o protează mitocondrială și c) reducerea activității enzimei, fără anomaliile menționate mai sus (a—b). Răspunsul favorabil la piridoxină are loc în primele două situații (a—b) și este nul în ultima (c). Dozele mari de piridoxină acționează în primul tip de anomalie prin compensarea afinității enzimei pentru piridoxal-fosfat iar în al doilea tip prin menținerea unui nivel înalt al holoenzimei față de apoenzimă, astfel că previne degradarea acesteia de către proteaza mitocondrială (114, 127, 128).

Au fost descrise și alte anomalii în sinteza protoporfirinei ca deficitul enzimei coproporfirinogen oxidaza care explică nivelul ridicat de coproporfirină eritrocitară sau cel, mult mai rar întâlnit, al ferochelatazei (hemisintetaza) (21, 52, 58, 102, 112).

În forma autosomală este afectată de asemenea activitatea δ-AL sintetazei, ceea ce explică apariția în urină a esterilor de acid α-amino β ketoadipic (produsul de sinteză anterior acidului deltaaminolevulinic în lanțul de formare a protoporfirinei) (52, 120).

Tabloul clinic este același în ambele forme. Anemia poate apărea la naștere, în copilărie sau la vârsta adultă, fără să se cunoască factorii care întârzie uneori debutul clinic; o explicație pentru aceasta ar fi prezența în alimentație a cantității mai mari de piridoxină la cei cu debut târziu. Pe lângă simptomele și semnele clinice legate de anemie, bolnavii prezintă manifestările supraîncărcării cu fier. Hepatosplenomegalia este în general moderată. Biopsia ficatului arată cantități mari de fier în celulele hepatice și în celulele Kupffer, și un grad de fibroză (vezi fig. XXI.11). Diabetul zaharat este întâlnit la 30% din bolnavi. Tulburările cardiace legate de hemocromatoză apar târziu în cursul bolii. Tegumentele pot fi hiperpigmentate sugerând supraîncărcarea cu fier.

Examene de laborator. Anemia este în general severă, microcitoza și hipocromia sunt trăsăturile morfologice caracteristice ale eritrocitelor. Anizocitoza, poikilocitoza, celulele în semn de tras la țintă, dimorfismul ca și eritrocitele cu punctații bazofile sunt alte anomalii morfologice prezente. Leucocitele și trombocitele sunt în număr normal. Măduva osoasă prezintă hiperplazie eritromegaloblastică. Megaloblastoza poate fi indusă de deficitul de folați. Macrofagele din măduvă conțin cantități mari de fier. Sideroblaștii inelari (10—40%) sunt întâlniți în eritroblaștii policromatofili și oxifili (21, 52) (fig. XXI.10).

Studiile de eritroferokinetică pun în evidență o eritropoieză ineficientă, asociată mai rar cu un aspect hipoproliferativ al măduvei osoase.

Biopsia hepatică depistează cantități mari de fier în hepatocite ca și în celulele Kupffer și diferite grade de scleroză (fig. XXI.11).

La aproximativ 30% din bolnavi sunt prezente tulburări în metabolismul triptofanului, caracterizate prin eliminarea de acid xanturenic și acid kinurenic după încărcarea prealabilă cu triptofan (114). Aceste tulburări au fost considerate ca anomalii în activitatea piridoxinei care intervine activ în metabolismul triptofanului; alte cercetări au sugerat că

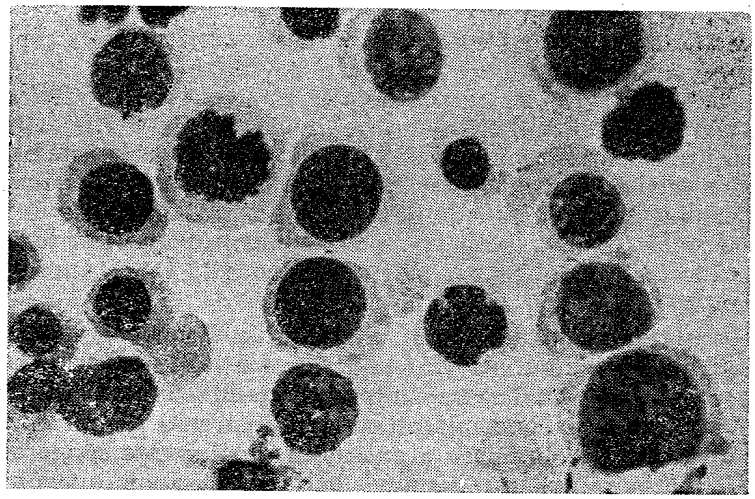


Fig. XXI.10. — Măduva osoasă în anemia sideroblastică ereditară.

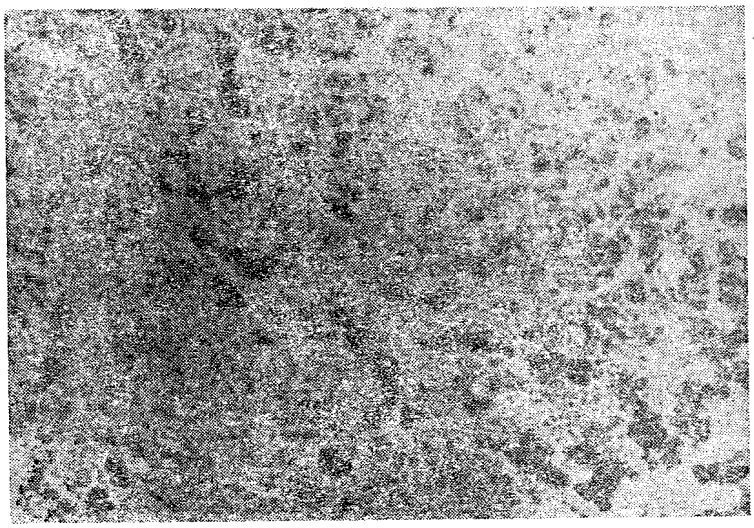


Fig. XXI.11. — Secțiune histologică de ficat în hemocromatoza secundară (anemie sideroblastică ereditară).

eliminarea de acid kinurenic și xanturenic ar fi indusă de activitatea unei enzime hepatice denumită triptofan pirolaza (114).

Protoporfirina liberă eritrocitară este redusă mai ales în eritrocitele hipocrome (116). În cazuri mai rare poate crește coproporfirina eritrocitară.

În forma autosomală (tipul II Heilmeyer) se depistează, în urina bolnavilor un ester, o hidrazonă a acidului α-amino-β ketoadipic (52).

Tratamentul constă în administrarea de piridoxină, în doze de 100—250 mg/zi (necesitățile fiziologice sunt de 1,5—2 mg/zi).

Răspunsul la piridoxină este variabil. Aproximativ 50% din bolnavi răspund optimal: reticulocitele cresc, Hb revine la valori apropiate de cele normale, fierul seric scade, protoporfirina liberă eritrocitară crește și anomaliile din metabolismul triptofanului dispar (52, 114, 127). Anomaliile morfologice nu dispar însă niciodată. Alți bolnavi au un răspuns parțial, cu o creștere moderată a cifrei de Hb, iar unii nu răspund deloc. La cei care au răspuns complet se administrează un tratament de întreținere continuu cu vitamina B_6. Întreruperea tratamentului cu piridoxină duce sigur la recădere. Megaloblastoza se tratează cu acid folic. Androgenii pot avea un efect parțial.

Hemocromatoza se tratează cu chelanți de fier de tip desferal cu rezultate bune ce constau atât în scăderea cantității totale de fier din organism, cât și în normalizarea sintezei hemului. Tratamentul cu substanțe chelante se face concomitent cu administrarea de piridoxină (19, 51, 81). O altă cale de eliminare a excesului de fier este sângerarea prin flebotomie. Bolnavii care nu răspund la piridoxină au o evoluție mai severă cu complicații cardiace, insuficiență hepatică etc. legate de supraîncărcarea cu fier (127).

ANEMIILE SIDEROBLASTICE DOBÂNDITE

ANEMIA REFRACTARĂ SIDEROBLASTICĂ IDIOPATICĂ (ARSI)

Face parte din grupa de forme primare dobândite. A fost descrisă de Björkman și Dacie care au numit-o anemia refractară normoblastică. Nu se cunoaște etiologia, dar trăsăturile sale clinice și biologice, ca și apartenența la sindromul mielodisplazic a unui număr important de cazuri, o definesc ca o entitate bine conturată.

Patogenie. Boala este dobândită, iar existența a două populații de eritrocite și de normoblaști sugerează o proliferare clonală indusă probabil printr-o mutație somatică. Această supoziție este confirmată de prezența unor anomalii cromosomiale frecvent întâlnite (85, 103); trisomia 8^+ și deleția brațului lung la cromosomului 20 (20 q—). Alteori se întâlnește pierderea cromosomului Y și deleția cromosomului 11 (11q—). Anomaliile cromosomiale nu au fost întâlnite în limfocite sau fibroblaști, ci numai în celulele medulare, ceea ce atestă afectarea celulei stem hematopoietice din măduvă (85, 103).

Natura clonală a bolii este atestată și de evoluția sa către o afecțiune malignă de tip leucemic acută, mieloidă în 10% din cazuri (52, 98) sau într-o eritremie, eritroleucemie ori mieloză cronică. Încadrarea ARSI în bolile mielodisplazice (preleucemice) pare astfel justificată pe deplin.

Alte cercetări au pus în evidență în unele cazuri anticorpi anticelule eritropoietice, ca și anticorpi de tip IgG ce inhibă sinteza hemului (73). Tratamentul cu substanțe imunosupresoare a dat în aceste cazuri rezultate favorabile. Boala poate avea deci uneori un caracter autoimun (73, 127).

În sfârșit o altă serie de studii au arătat că boala ar fi indusă printr-un deficit în sinteza hemului, ca și celelalte anemii sideroblastice. Unii cercetători au găsit un deficit de hemsintetază și de deltaaminolevulin sintetază (63, 75). Studiile *in vitro* au confirmat aceste date, ca și ameliorarea, tot *in vitro*, a sintezei hemului prin adaos de piridoxal fosfat (114). În clinică însă piridoxal fosfatul nu dă rezultate similare celor din *vitro*. Nu se cunoaște natura dobândită a tulburării sintezei hemului, dar unele studii au sugerat că ea ar putea fi indusă de o leziune mitocondrială deoarece, pe lângă cele 2 enzime mitocondriale deficitare, citate mai sus, o serie de alte enzime mitocondriale (citocromoxidaza, ATP-aza și serinproteaza) sunt de asemenea deficitare (6, 63, 75).

În concluzie, cercetările asupra patogeniei ARSI indică o heterogenitate a acestei boli; în unele cazuri boală clonală, cu afectarea celulei stem hematopoietice ce face parte din stările mielodisplazice (preleucemice) la cel puțin 10% din bolnavi, boală autoimună în altele și în sfârșit anomalie enzimatică sau boală mitocondrială în majoritatea cazurilor (98, 127).

Tablou clinic. Boala apare la bolnavi în vârstă (media în jur de 50 de ani), cu o repartiție egală între sexe.

Debutul este insidios, cu simptomele și semnele legate de anemie. În 40% din cazuri este prezentă o hepatosplenomegalie de diferite grade.

Examene de laborator. Anemia, de obicei moderată, este normo- sau ușor macrocitară. În sângele periferic, ca și în măduva osoasă, există adesea două populații de eritrocite — una normală și una de eritrocite hipocrome care au de obicei și punctații bazofile.

Leucopenia și trombocitopenia sunt prezente la 35% din bolnavi. La aproximativ 50% din cazuri fosfataza alcalină leucocitară est redusă sau absentă (98, 103, 127).

Măduva osoasă este hipercelulară cu megaloblastoză în 20—30% cazuri. Reacția PAS este negativă în eritroblaști ceea ce o diferențiază de eritremie, în care eritroblaștii au reacția PAS pozitivă. Sideroblaștii inelari sunt prezenți în procente variabile (40—90%), dar întotdeauna peste 15%. Spre deosebire de formele ereditare și secundare, normoblaștii bazofili sunt inelari (52, 127, 128).

Transferina este saturată 90—100% la 30% din bolnavi (117). Feritina serică este crescută ca în hemocromatoză (117). Protoporfirina liberă eritrocitară este, spre deosebire de forma congenitală crescută, putând ajunge la valori de 3—10 ori mai mari ca cele normale (16—36 μg/100 ml) (5, 116). Eritroferokinetica pune în evidență eritropoieza ineficace (98, 127).

În urină eliminarea de acid δ-aminolevulinic și de coproporfirină este mult crescută, iar cea de porfobilinogen variabilă.

Biopsia hepatică pune în evidență o sideroză importantă, ce poate fi prezentă și în alte organe.

Evoluție, complicații, prognostic. ARSI este o boală cu evoluție îndelungată. Supraviețuirea medie pentru bolnavii ce necesită tratament (perfuzii de sânge plus alte tratamente) este de 7 ani (72). Pentru bolnavii care nu necesită tratament o prioadă îndelungată de timp (evaluată în ani) supraviețuirea medie este de 15 ani (72).

În general, în marea majoritate a cazurilor, evoluția se complică cu suferințe legate de hemocromatoză: hepatosplenomegalie, insuficiență cardiacă, diabet zaharat, insuficiență renală și infecții (72, 98, 127). La bolnavii care au pancitopenie de la debut, apariția infecțiilor și a sindromului hemoragic complică și mai mult evoluția (130).

Aproximativ 10% din cazuri evoluează însă către o leucemie acută mieloidă și mai rar către o mielofibroză, leucemie granulocitară cronică sau eritremie cronică (127). Apariția leucemiei are loc după o perioadă variabilă de timp (1—9 ani). Cercetările repetate ale măduvei oaselor au pus în evidență anumite modificări semnificative cu valoare predictivă prognostică, în sensul dezvoltării unei clone maligne: popularea progresivă cu celule blastice imature (mieloblaști), existența unei clone anormale la examenul citogenetic, apariția de modificări cromosomiale în plus, scăderea progresivă a capacității măduvei osoase de a forma colonii granulomonocitare (72, 98, 103, 127). Situațiile în care formarea de colonii este foarte redusă până la absență, cu formarea numai de grămezi *(cluster)*, anunță transformarea leucemică; de altfel această modalitate de creștere a măduvei *in vitro* este caracteristică leucemiei acute (127).

Bolnavii a căror măduvă rămâne cu un număr mic de mieloblaști (<5%), care nu au o clonă anormală și a căror culturi de măduvă arată o formare normală de colonii, fac parte din grupul cu supraviețuire lungă și nu prezintă de obicei transformarea leucemică (72, 127, 130).

Tratament. Bolnavii cu o boală neevolutivă de-a lungul multor ani şi care nu prezintă suferinţe legate de boală, nu necesită tratament şi se menţin numai în observaţie.

Pentru bolnavii cu suferinţe legate de boală, mijloacele terapeutice sunt numeroase, dar nici unul nu dă rezultate satisfăcătoare.

Corticoterapia se încearcă iniţial în toate cazurile deoarece aproximativ la 5% din bolnavi poate avea rezultate satisfăcătoare (127). Dacă după 1—2 luni de tratament nu s-au obţinut rezultate, continuarea corticoterapiei este inutilă.

Administrarea de piridoxină 100—200 mg/zi este de asemenea recomandată, deşi rezultatele sunt modeste. Numai bolnavii cu activitate redusă a piridoxal kinazei au un răspuns favorabil la administrarea parenterală de piridoxal-5'-fosfat (114).

Androgenoterapia, cu doze de 50—300 mg/zi de oximetholon (Anapolon) a dat rezultate la bolnavii dependenţi de perfuzii de sânge. Un alt anabolizant, Danazolul a fost folosit cu oarecare succes în formele cu trombocitopenie (36, 127).

În cazurile în care s-a depistat un mecanism autoimun se aplică tratament imunosupresor (azathioprin) cu rezultate apreciabile (73). La bolnavii la care s-a decelat o clonă anormală s-a încercat tratamentul cu citostatice (Cytosin — arabinoside în doze mici) sau cu substanţe reversoare (acid retinoic etc.) sau modificatori biologici (eritropoietină, factori de stimulare a coloniilor GM cu IL-3 (v. cap. Mielodisplazii) (27, 128, 130).

În aplicarea tratamentului de substituţie (perfuzii sânge) este necesar a se ţine cont de indicaţii, de riscul izo- şi aloimunizării şi de cel al agravării depunerii în organe de fier, cu hemocromatoză transfuzională.

Uneori au fost obţinute ameliorări prin administrare combinată de vitamine B_1, B_2 şi B_6 sau de doze mari de vitamină C şi acid folic.

ANEMIILE SIDEROBLASTICE SECUNDARE

Etiologie. Formele secundare apar în următoarele situaţii: expunerea la anumite medicamente şi substanţe chimice cu efect toxic, boli neoplazice, inflamatorii şi alte afecţiuni hematologice primare. Agenţii etiologici sunt expuşi în tabelul 21.XIII.

TABELUL 21.XIII

Cauzele anemiilor sideroblastice secundare

A. **Substanţe toxice şi medicamente**
   a) *Toxice:* plumb, etanol
   b) *Medicamente:* tuberculostatice (HIN, cicloserină), cloramfenicol, citostatice (azot-muştar, melphalan etc.), substanţe imunosupresoare (azathioprin)

B. **Boli cronice**
   a) *Boli inflamatorii şi infecţioase:* artrită reumatoidă, lupus eritematos, alte colagenoze, infecţii cronice (pionefroză)
   b) *Boli ale sângelui şi organelor hematopoietice:* boala Hodgkin, limfoame, mielom, leucemii, policitemia vera, mielofibroza, anemii hemolitice, anemii megaloblastice
   c) *Neoplazii:* carcinoame
   d) *Alte boli:* mixedem, tireotoxicoză, uremie, porfiria eritropoietică, porfiria *cutanea tarda*

Medicamente și substanțe chimice. Frecvența cea mai mare a anemiilor sideroblastice secundare a fost consemnată în tratamentul cu tuberculostatice, cloramfenicol, citostatice, precum și în intoxicația cu plumb și alcool etilic.

Unele *tuberculostatice* ca hidrazida acidului izonicotinic (HIN) și cicloserina au fost adesea incriminate în producerea de anemii sideroblastice (91). Tabloul morfologic se caracterizează prin hipocromie cu microcitoză și sideroblaști inelari, în diferite procente în măduva osoasă. Sideremia este crescută și există o tendință de supraîncărcare cu fier. Întreruperea tratamentului cu medicamentele în cauză duce la remiterea anemiei și a tulburărilor legate de aceasta. De asemenea, dacă în cursul tratamentului cu HIN se administrează vitamina B_6 în doze mari, cifra de Hb se menține la valori normale. HIN și celelalte medicamente antituberculoase interferează metabolismul piridoxinei, formând cu piridoxalfosfatul o hidrazină (ester) ce inhibă piridoxal kinaza, enzima ce convertește transformarea piridoxinei în piridoxal fosfat (55, 91, 127).

Este de asemenea probabil ca factori genetici și nutriționali să determine o susceptibilitate a unor pacienți la această acțiune a medicamentelor (91).

Cloramfenicolul acționează asupra mitocondriei eritroblaștilor, inhibând sinteza unor proteine, inclusiv a hemsintetazei (96). Anemii sideroblastice au fost observate și în tratamentele cu citostatice: azot-mustar, melphalan, azathioprin etc. (127).

Alcoolul induce boala la circa 30% din alcoolici, în special la cei cu malnutriție. Tabloul morfologic al anemiei indusă de alcool cuprinde: dimorfism eritrocitar, prezența în măduvă de 10—65% sideroblaști inelari în stadiile policromatofile și oxifile, vacuolizarea citoplasmei eritroblaștilor, megaloblastoză prin carență de acid folic, hipersegmentarea neutrofilelor. Sideremia este crescută și nivelul folaților serici este subnormal. Protoporfirina și coproporfirina liberă eritrocitară sunt crescute. De asemenea nivelul seric al piridoxal fosfatului este subnormal. Administrarea de piridoxal fosfat împiedică apariția anemiei, chiar dacă alcoolul este consumat în continuare (54, 55). Suprimarea alcoolului produce în 5—10 zile o reticulocitoză și dispariția sideroblaștilor inelari.

Studiile efectuate au arătat că alcoolul blochează conversia piridoxinei în piridoxal fosfat (54). Alte cercetări au dovedit un deficit în sinteza proteinelor, ceea ce explică tabloul de malnutriție, ca și reducerea activității hemisintetazei și a altor enzime din sinteza protoporfirinei.

Intoxicația cronică cu plumb sau *saturnismul* este cunoscut în mediile industriale cu expunere la substanțe ce conțin plumb, la copiii care consumă accidental vopsele ce conțin plumb sau la cei ce consumă alcool distilat în vase de plumb, situație în care intervine în plus și acțiunea toxică pe măduva osoasă a alcoolului.

Experimental plumbul induce o acumulare de fier în mitocondriile eritroblaștilor cu formare de sideroblaști inelari.

Patogenie. Anemia din saturnism este din punct de vedere eritrokinetic destul de complexă: ea are o componentă hemolitică periferică, datorită leziunilor membranei eritrocitelor, eritropoieza este ineficace prin anomaliile din sinteza protoporfirinei care fac neviabili eritroblaștii medulari și are, de asemenea, un aspect hipoproliferativ al măduvei osoase.

Toate aceste anomalii complexe sunt induse de efectul toxic al plumbului asupra țesutului medular și explică severitatea anemiei în multe cazuri (118, 127).

Defectul în sinteza hemului depinde de concentrația plumbului care afectează (blochează) mai ales deltaaminolevulin dehidraza (δ-AL-dehidraza) enzimă ce convertește acidul deltaaminolevulinic (δ-AL) în porfobilinogen (PBG), primul nucleu pirolic în lanțul de sinteză a protoporfirinei (118, 127).

O altă enzimă afectată de plumb este hemsintetaza sau fierchelataza, care inseră fierul în protoporfirina IX. Consecința acestor blocări în sinteza hemului este creșterea masivă a acidului δ-AL cu eliminarea sa urinară ce ajunge la valori de 10—12 ori mai mari decât cele normale de 2,4 mg/l/24 ore (52, 118, 127). Această anomalie biochimică este caracteristică saturnismului și îl deosebește de porfiria acută intermitentă ce poate avea adesea un tablou clinic similar, în care însă în urină se elimină cantități mari de porfobilinogen (127).

Datorită blocării hemsintetazei, protoporfirina liberă eritrocitară este mult crescută peste valorile normale de 39 μg/dl. Concomitent există și o blocare a coproporfirinoxidazei care explică creșterea coproporfirinei eritrocitare (peste 1,3 μg/dl) (118, 127).

Tot din cauza acestor blocaje enzimatice se produc și eliminările urinare crescute de coproporfirină (peste 50 μg/zi) și uroporfirină (peste 8 μg/zi), care alături de eliminarea urinară crescută de acid deltaaminolevulinic sunt patognomonice pentru intoxicația cu plumb.

Nivelul sanguin al plumbului crește de la valorile normale de 15—40 μg/dl la 60—80 μg/dl, la cifra de 80 μgPb/dl tratamentul intoxicației devine obligatoriu. Creșterea eliminării de plumb prin urină peste 80 μg/24 ore, este caracteristică pentru diagnosticul de saturnism (98, 127, 128).

În cazurile limită în care plumburia nu este concludentă, se efectuează un test de mobilizare a plumbului cu 0,5—1 g EDTA și dacă prin urină se elimină peste 80—100 μg Pb/24 ore, se poate stabili diagnosticul de saturnism (94). Se mai constată și eliminarea urinară de cantități crescute de acid δ-AL și coproporfirină (118, 127).

Tabloul clinic este bine conturat: bolnavii au lizereu cenușiu gingival, colici abdominale, uneori de o intensitate care sugerează un abdomen acut, paloarea tegumentelor și adesea manifestări de polinevrită (118).

Examenul sângelui periferic arată o anemie ușor hipocromă cu eritrocite microcitare în proporții variabile. La bolnavii care au carență de fier concomitentă, ca de exemplu la copii și femei, hipocromia este mai accentuată. Cifra de reticulocite este crescută și prezența de punctații bazofile în peste 5% din eritrocite completează tabloului sângelui periferic.

Prezența punctațiilor bazofile într-un procent ridicat a fost atribuită deficitului de pirimidin nucleotidază, indus de către plumb care reduce activitatea ergastoplasmei (118, 127).

Substratul material al punctațiilor bazofile este alcătuit din resturi de ergastroplasmă (127).

Măduva osoasă este normoplazică cu o creştere procentuală a eritroblaştilor, care au deficit de maturaţie; sideroblaştii inelari sunt prezenţi în procente variabile.

Alte investigaţii de laborator pun în evidenţă o fragilitate mecanică crescută a eritrocitelor, în contrast cu cea osmotică, ce apare redusă.

La aproximativ 15% din bolnavi creşte HbA_2 şi HbF (16). Fierul seric este crescut. Durata de viaţă a eritrocitelor este moderat scăzută. Investigaţiile cu Fe^{59} reflectă o ineficienţă a eritropoiezei, asociată cu un aspect de obicei hipoproliferativ al măduvei osoase. În tabelul 21.XIV sunt

TABELUL 21.XIV

Modificări hematologice şi clinice în anemia saturnină

	Normal	Anemia saturnină
Hb (g/dl)	14—18	10,7 (7—12)
VEM (fm sau μ_3)	89 (83—96)	79 (70—92)
CHEM (g/dl) (concentraţia Hb eritrocitară medie)	34 (32—36)	31 (27—36)
Reticulocite %	1,6 (0,6—2,7)	4,4 (1,5—11,6)
Eritrocite cu punctaţii bazofile %	absente	2 (0,1—7,5)
Leucocite (x 10^9/L)	4—11	4—15

Simptome şi semne clinice (frecvenţă)

Durere abdominală	80%	Tulburări motorii	40%
Constipaţie	70%	Hipertensiune arterială	25%
Vărsături	60%	Febră	20%
Scăderea forţei musculare	50%	Mialgii	15%
Parestezii	20%	Eritrocite cu punctaţii bazofile	80%
Tulburări psihice	20%	Proteinurie	7%
Crize de epilepsie	1%		
Anemie	85%		
Lizereu gingival	78%		
Durere abdominală la palpare (apărare)	50%		

expuse modificările importante hematologice şi clinice ale intoxicaţiei cu plumb.

Tratamentul constă în suprimarea introducerii plumbului în organism şi în administrarea de EDTA 0,5—1 g/zi în perfuzii lente, în cure de 3—5 zile, repetate după 5 zile de pauză. Administrarea lentă a perfuziilor cu EDTA este obligatorie din cauza efectului nefrotoxic al acestui agent chelant (127). În formele uşoare sau ca tratament de întreţinere se utilizează D-penicilamina 1 g/zi timp de 10 zile, urmată de 15 zile pauză, controlându-se plumburia, până ce aceasta ajunge la valori normale. În timpul tratamentului cu penicilamină, datorită antagonismului acesteia cu vitamina B_6, este necesară administrarea de 100—200 mg vitamină B_6 pe zi şi de oligoelemente (Fe, K, Ca, Cu, Mn, Mg, Zn) pentru a preveni pierderile acestora induse prin chelare (118, 127).

ANEMIILE SIDEROBLASTICE DIN BOLILE INFLAMATORII

Au fost descrise în colagenoze, îndeosebi în artrita reumatoidă, ca și în pionefroze. Mecanismul de bază constă tot în afectarea sintezei hemului cu consecințele respective. Tratamentul este cel al bolii cauzale, la care se adaugă piridoxină în doze mari (99, 127).

ANEMIILE SIDEROBLASTICE DIN NEOPLAZII DE ORGAN ȘI HEMOPATII MALIGNE

Pot preceda instalarea bolii, dar de cele mai multe ori însoțesc boala malignă (99, 127). Prezența lor în boala Hodgkin, policitemia vera, mielofibroza cu metaplazie mieloidă sau mielom multiplu care au fost tratate îndelung sau intensiv cu citostatice, are o semnificație prognostică importantă, deoarece poate anunța instalarea unei leucemii acute secundare, a doua malignitate, indusă de substanțe mutagene (v. cap. Leucemii acute) (99, 127).

Au mai fost descrise anemii sideroblastice după rezecții gastrice (prin tulburări nutriționale în metabolismul proteinelor), mixedem, tireotoxicoză, porfiria *cutanea tarda* și în formele severe de anemie Biermer (99, 127, 128).

BIBLIOGRAFIE

1. ALI A. M. și colab.: Transfusion 1985; 25: 286.
2. ALTMAN I. C.: Ann. Int. Med. 1988; 109: 316.
3. AMITAI A. și colab.: Acta Haemat. 1982; 68: 341.
4. AKNOUTH S. și colab.: J. Med. Res. 1987; 85: 576.
5. ARNONA I. O. și colab.: Blood 1988; 72 (4): 1416.
6. AOKI Y. și colab.: J. Clin. Invest. 1974; 53: 1326.
7. ASAI F. și colab.: J. Pharmacol. 1991; 57: 291.
8. BALLING H. și colab.: Folia Haematologica 1987; 117: 238.
9. BALMER S. E. și colab.: Arch. Dis. Child 1991; 66 (12): 1390.
10. BARTON J. R.: Am. J. Obst. Gynaecol. 1992; 166: 576.
11. BEGUIN Y. și colab.: Blood 1993; 81 (24): 1067.
12. BERNSTEIN S. P.: J. Lab. Clin. Med. 1987; 110: 690.
13. BESSMAN D. și colab.: Am. J. Clin. Path. 1983; 80: 322.
14. BIRGEGARD G. și colab.: Br. J. Haemat. 1987; 65: 479.
15. BLAKE D. R. și colab.: Br. Med. J. 1981; 283: 1147.
16. BLAU C. A. și colab.: Blood 1993; 81: 214.
17. BOYD H. K. și colab.: Br. J. Rheum. 1991; 30: 255.
18. BRUGMAN C. și colab.: Blood 1993; 81: 956.
19. BRITTENHAM M. G. și colab.: Blood 1992; 80: 569.
20. BUCHANAN G. R. și colab.: JAMA 1981; 346: 861.
21. BUCHANAN G. R. și colab.: Blood 1980; 55: 109.
22. BUTKOVSKI R. J. și colab.: J. Biol. Chem. 1987; 262: 7874.
23. CALLINAN V. și colab.: Am. J. Med. 1988; 85: 440.
24. CAMERON A. J. și colab.: Gastro-Enterology 1986; 9: 338.
25. CAVILL I. și colab.: Br. J. Haemat. 1982; 50: 583.
26. CAZZOLA M. și colab.: Br. J. Haemat. 1983; 53: 659.
27. CAZZOLA M. și colab.: Blood 1992; 79: 29.
28. CLOUSE R. E. și colab.: Arch. Int. Med. 1985; 145: 458.
29. COFFMAN T. J. și colab.: J. Clin. Invest. 1990; 86: 1030.
30. CORRIN B. și colab.: J. Path. 1987; 153: 249.
30a. COTTER P. D. și colab.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992; 89: 4028.
30b. COX C. T.: New Engl. J. Med. 1994; 330: 675.

31. CHRISTOFFEL K.: J. Ped. 1985; 107: 315.
32. CROSBY W. H. şi colab.: JAMA 1984; 251: 1986.
33. DEISS A. şi colab.: J. Clin. Invest. 1966; 45: 353.
34. De MAEYER E. şi colab.: Wld Hlth Quart. 1985; 38: 302.
35. De VIZIA B. şi colab.: J. Ped. 1985; 107: 75.
36. DOLL D. C.: Acta Haemat. 1987; 77: 170.
37. D'ONOFRIO G. şi colab.: Arch. Pathol. Lab. Med. 1992; 116: 84.
38. DOUGLAS S. W. şi colab.: Blood 1975; 45: 55.
39. DUDRICK S. J.: Arch. Surgery 1985; 120: 721.
40. DUNCAN B. şi colab.: J. Ped. Gastroent. Nutr. 1985; 3: 421.
41. DUNLOP W. M. şi colab.: Ann. Int. Med. 1974; 80: 470.
42. FEY M. F. şi colab.: Br. Med. J. 1988; 296: 1504.
43. FLYNN M. M. şi colab.: Am. J. Clin. Path. 1986; 85: 445.
44. FUCHS D. şi colab.: Ann. Int. Med. 1992; 116: 520.
45. GORDENK V. R. şi colab.: Blood 1986; 67: 745.
46. HOLLIDAY H. L. şi colab.: Arch. Dis. Child. 1985; 60: 69.
47. HOLLBERG I. şi colab.: Zschr. f. Ernähr. Forsch. 1985; 27: 177.
48. HARRIS J. W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956; 91: 427.
49. HAMIL R. L. şi colab.: Am. J. Clin. Path. 1991; 96: 245.
50. HANN H. W. şi colab.: Cancer 1991; 68: 2407.
51. HERSCHKO C. şi colab.: Blood 1991; 77: 2049.
52. HEILMEYER L.: Schw. Med. Wschr. 1962; 42: 1281.
53. HEILMEYER L.: Schw. Med. Wschr. 1961; 9: 1203.
54. HEINES J. D.: Br. J. Haemat. 1969; 16: 87.
55. HENRY M. L. şi colab.: Am. J. Surg. 1986; 151: 362.
56. HO C. H. şi colab.: Int. J. Gynaecol. 1987; 25: 291.
57. HOFFMAN A. N.: Gastroenterology 1988; 94: 508.
58. HORRIGAN G. L. şi colab.: Blood 1973; 42: 87.
59. HUARANI F. şi colab.: Blood 1993; 81: 1108.
60. HUGGENVIK I. J. şi colab.: Blood 1989; 74: 482.
61. HURWITZ H. şi colab.: Arch. Dis. Child. 1986; 61: 194.
62. IRIGOEN M. şi colab.: Pediatrics 1991; 88: 320.
63. IBRAHAM N. L.: J. Lab. Clin. Med. 1985; 105: 593.
64. JACOBS A. şi colab.: Lancet 1965; 21: 407.
65. JANSSON L. T. şi colab.: Blood 1985; 65: 959.
66. JOASTEN E. şi colab.: Am. J. Med. 1991; 90: 653.
67. JOFFE G. şi colab.: Clin. Ped. 1981; 20: 226.
68. KANAKAKORN K. şi colab.: Br. J. Haemat. 1973; 25: 637.
69. KASPER C. K. şi colab.: JAMA 1965; 191: 359.
70. KAUFMANN T. şi colab.: Dtsch. med. Wschr. 1987; 112: 1277.
71. KAYE F. J. şi colab.: M. Sinai J. Med. 1985; 52: 319.
72. KERNDRUP G.: Blut 1987; 54: 231.
73. KIM-RITCHEY A. şi colab.: Blood 1979; 54: 734.
74. KIVIJARVI A. şi colab.: Obstet. Gynaecol. 1986; 67: 95.
75. KONOPKA L. şi colab.: Br. J. Med. 1979; 42: 73.
76. KONIJA A. M. şi colab.: Br. J. Haemat. 1977; 37: 7.
77. LAYRISSE M. şi colab.: Int. Ztschr. f. Ernahrforsch. 1985; 27: 105.
78. LEE G. R.: Sem. Haemat. 1983; 20: 61.
79. LIPSCHITZ D. A.: J. Am. Geriatr. 1990; 38: 1258.
80. LOZOFF B. şi colab.: New Engl. J. Med. 1991; 325: 687.
81. LYTTON S. D. şi colab.: Blood 1993; 81 (1): 214.
82. LAMPARELLI R. D. şi colab.: Am. J. Clin. Nutr. 1987; 46: 335.
83. LEMLEY D. E. şi colab.: J. Rheum. 1986; 13: 954.
84. MAMUS S. W. şi colab.: Exp. Haemat. 1986; 14: 1015.
85. MECUCI C. şi colab.: Cancer gen. cytogenet. 1987; 27; 39.
86. MEANS R. T. şi colab.: Blood 1987; 70: 139.
87. MEANS R. T. şi colab.: Blood 1992; 79: 2797.
88. Mc.CLINE S. şi colab.: JAMA 1985; 253: 1021.
89. MIGUEL A. şi colab.: Acta Haemat. (Basel) 1988; 90; 59.
90. MITCHEL A. B. şi colab.: Practitioner 1974; 213: 370.
91. Mc.CURDY P. R. şi colab.: Blood 1966; 27: 352.
92. MITTELMAN M. şi colab.: Blood 1992; 80 (3): 841.

93. Mc.DOUGAL I. C. şi colab.: Br. Med. J. 1992; 304: 225.
94. MARKOWITZ M. E.: J. Ped. 1991; 119: 305.
95. MOHAUDAS N. şi colab.: Blood 1986; 68: 606.
96. MUNTEANU N.: Viaţa Med. 1968; 19: 1351.
97. MUNTEANU N., POPESCU R. E.: Doc. Haemat. 1967; 2: 14.
98. MUNTEANU N.: În BERCEANU ŞT. (ed.): Hematologie. Edit. Medicală, Bucureşti, 1977, 442.
99. NAMEH N. şi colab.: Med. Clin. North Am. 1980; 64: 631.
100. NICKERSON H. şi colab.: Am. J. Dis. Child 1985; 139: 1115.
101. PATTERSON W. P. şi colab.: Ann. Int. Med. 1988; 94: 508.
102. PASANEN A. V. şi colab.: Sci. J. Haemat. 1985; 34: 253.
103. PRIETO F. şi colab.: Cancer genet. cytogenet. 1987; 2: 367.
104. POLLACK S.: Blood 1992; 80: 3252.
105. POZO-RODRIGUEZ F. şi colab.: Thorax 1980; 35: 399.
106. QUATTRIN N. şi colab.: Blut 1974; 28: 327.
107. REHM S. R. şi colab.: Am. J. Med. 1991; 90: 718.
108. RODMAN G. D. şi colab.: Exp. Haemat. 1987; 15: 928.
109. RYBO E. şi colab.: Sci. J. Haemat. 1985; 34: 5.
110. SHIMADA Y. şi colab.: Blood 1993; 81: 935.
111. SCHWICK H. G. şi colab.: J. Clin. Chem. 1978; 16: 73.
112. STEVEN P. şi colab.: Sci. J. Gastroent. 1985; 107: 73.
113. SCOTT J. şi colab.: J. Clin. Path. 1985; 38: 1025.
114. SOLOMON R. L. şi colab. Br. J. Haemat. 1969; 42: 239.
115. STOCKMAN J. A. şi colab.: J. Lab. Clin. Med. 1975; 85: 113.
116. STOCKMAN J. A. şi colab.: JAMA 1987; 258: 1645.
117. THOMPSON W. G.: Arch. Int. Med. 1988; 148: 333.
118. TEPPER A. şi colab.: Am. J. Publ. Health. 1992; 82: 275.
119. VREUDENHIL G. şi colab.: Ann. Rheum. Dis. 1990; 49: 39.
120. VOGLER W. R. şi colab.: Blood 1968; 32: 979.
121. WILLMAN N. şi colab.: Acta Gynacol. Scand. 1987; 66.
122. WAHNER-ROEDLER L. S. şi colab.: J. Lab. Clin. Med. 1975; 85: 253.
123. WHITTER C. F. şi colab.: Clin. Toxicol. 1971; 4: 603.
124. WEINTRAUB L. R. şi colab.: New Engl. J. Med. 1966; 275: 169.
125. WESTERHAUSEN M. şi colab.: Acta Haemat. 1977; 57: 96.
126. WEBER M. şi colab.: Clin. Exp. Med. 1987; 57: 262.
127. WINTROBE M. M.: Clinical Haematology, Edit. Lee Febiger, 1981.
128. WILLIAMS J. W.: Haematology. McGraw-Hill, New York, 1990.
129. ZAUJANI E. D. şi colab.: Br. J. Haemat. 1982; 50: 479.
130. YOSHIDA Y. şi colab.: New Engl. J. Med. 1991; 325: 662.

XXII

ANEMIILE MEGALOBLASTICE

T. HOSSU

Definiție. Anemiile megaloblastice sunt stări patologice având la bază o tulburare a diviziunii celulare prin sinteza scăzută a acizilor nucleici, caracterizată hematologic prin transformarea megaloblastică și hematopoieză ineficientă, datorate în majoritatea cazurilor deficitului de vitamină B_{12} sau de acid folic.

Fiziopatologia megaloblastozei. Sinteza deficitară a acizilor nucleici, în primul rând a ADN, care stă la baza transformării megaloblastice a seriilor celulare medulare (și a altor celule cu rată mare de diviziune), se datorează în majoritatea cazurilor deficitului de vitamină B_{12} sau acid folic, vitamine cu rol de coenzime în metabolismul unor aminoacizi, în sinteza *de novo* a nucleotidelor purinice (comune lanțurilor ARN și ADN), precum și în transformarea uridinei în timidină (conținută numai în ADN), reacție care explică afectarea cu precădere a sintezei ADN în deficitul acestora.

Ca urmare a sintezei deficitare de ADN are loc alungirea intervalului intermitotic (în care continuă sinteza de ARN și proteine), cu blocarea ultimelor diviziuni „de maturație", manifestate morfologic prin scăderea raportului *nucleo-citoplasmatic* și, respectiv, prin *asincronismul nucleo-citoplasmatic* de maturație, nucleul păstrând un aspect „tânăr", fin structurat, în timp ce citoplasma capătă caractere de maturitate (hemoglobinizare, granulații specifice); alte manifestări ale tulburării mecanismului diviziunii celulare sunt *mitozele atipice* (multipolare, cu cromosomi subțiri, în unghi ascuțit), tendința de *înmugurire a nucleului* și de *hipersegmentare* (în seria granulocitară și megacariocitară), aspecte de *cariorexis* și *resturi nucleare* (în seria eritrocitară), *poliploidia* cu nucleu unic sau multipli (în deficitele severe).

Urmarea directă a tulburării megaloblastice (mai evidentă în seria eritroblastică) este distrucția intramedulară crescută a acestor celule, care nu pot ajunge în stadiul de celule funcționale *(hematopoieză ineficientă)*,

evidențiată prin nivelul crescut al bilirubinei serice (cu creșterea „fracțiunii precoce" a acesteia) și al lactat dehidrogenazei (LDH), precum și scurtarea duratei medii de viață a eritrocitelor.

Consecința finală este *anemia,* care, prin stimulare eritropoietinică, duce la *hiperplazie eritroblastică,* tradusă, în funcție de intensitate, prin modificarea raportului E : G, creșterea densității celulare, transformarea hematopoietică a măduvei grăsoase, uneori chiar eritropoieză extramedulară, ceea ce accentuează deficitul de acid folic sau vitamină B_{12} prin consum crescut, închizând un cerc vicios, cu agravarea megaloblastozei (fig. XXII.1).

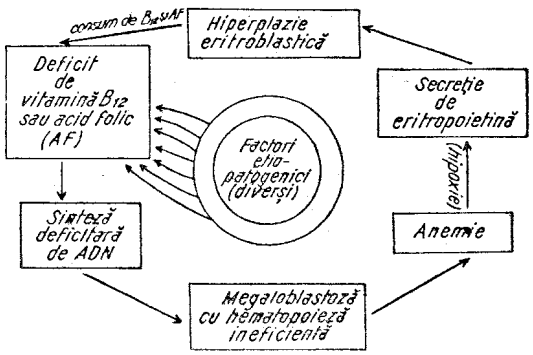


Fig. XXII.1. — Fiziopatologia megaloblastozei — schemă simplificată (explicații în text).

Hematopoieza ineficientă se manifestă și în seria granulocitară (prin creșterea muramidazei serice) și megacariocitară (prin scăderea producției medii de trombocite pe unitate nucleară la aproximativ 1/7 din valoarea normală), precum și prin scăderea granulocitelor și trombocitelor în sângele periferic (la care ar putea contribui și creșterea sechestrării splenice).

Morfologia megaloblastică urmează a fi prezentată în cadrul maladiei Addison-Biermer, în care apare în forma cea mai caracteristică.

Etiopatogenia ține, în majoritatea cazurilor, de deficitul de vitamină B_{12} sau acid folic, mai rar de alte cauze care pot influența pe diferite căi sinteza acizilor nucleici. Cum se va arăta există interferențe metabolice între cele două vitamine, vitamina B_{12} fiind necesară pentru transformarea metil-folatului în tetrahidrofolat, din care derivă toate coenzimele folice.

ANEMII MEGALOBLASTICE PRIN DEFICIT DE VITAMINĂ B_{12}

Structura și rolul fiziologic al vitaminei B_{12}. Molecula de vitamină B_{12} (ciancobalamina) (fig. XXII.2) este formată dintr-o porfirină specială (corina) cu un atom de cobalt central (legat — în forma medicamentoasă — de un radical cian) și o parte nucleotidică. Ea are formula brută $C_{63}H_{88}N_{14}PCo$ și greutatea moleculară de 1 355 d.

Dintre derivații rezultați din substituirea grupării cian (—C≡N) cu alți radicali, numai doi au fost dovediți a avea rol de coenzime:

a) *5 dezoxiadenozil-cobalamina,* ca transportor de hidrogen intermolecular (reacții de reducere) și intramolecular (reacții de izomerizare), din care la om nu s-a pus cu certitudine în evidență decât reacția de izomerizare a metilmalonil-CoA în succinil-CoA în cadrul metabolismului aci-

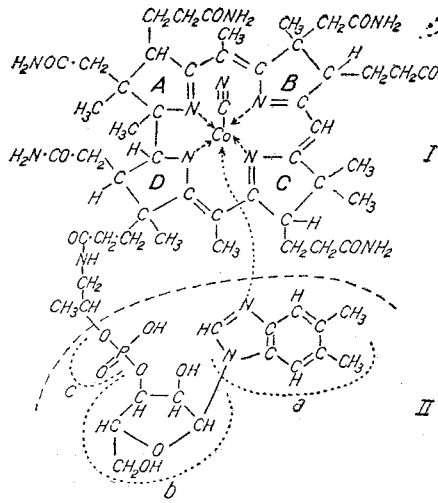


Fig. XXII.2. — Structura vitaminei B_{12} (Ciancobalamina).

Porțiunea *corinică* (I) este formată dintr-un nucleu tetrapirolic, în care inelele pirolice sunt legate între ele prin trei punți meten și o legătură directă (între A și D), având atașate în pozițiile exterioare grupări aminoetanol, aminopropanol și metil, iar în centru — un atom de cobalt, de care se leagă o grupare cian (deasupra) și porțiunea nucleotidică (sub planul corinic).

Porțiunea *nucleotidică* (II), formată din 5,6-dimetil-benzimidazol (a), riboză (b) și fosfat (c), care se leagă printr-un radical propionil de gruparea aminopropanol a pirolului D.

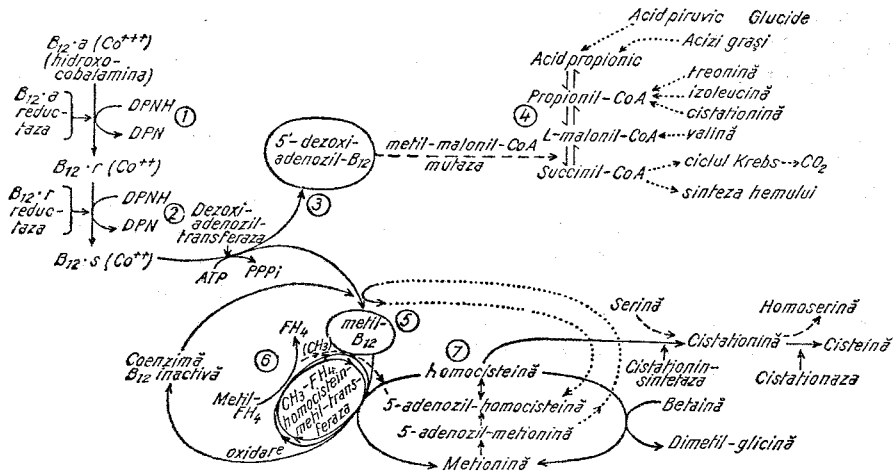


Fig. XXII.3. — Sinteza coenzimelor B_{12} și acțiunile lor metabolice. Sunt reprezentate cele două reducții ale hidroxocobalaminei, (1), (2), formarea 5'-dezoxiadenozil-B_{12} (3) cu rolul ei în metabolismul acidului propionic (4), formarea metil-B_{12} (5) cu funcția ei de intermediar în transferul grupărilor — CH_3 de la metil-FH_4 la homocisteină (6) (precum și rolul S-adenozil-metioninei în „regenerarea" acestei coenzime, în legătură cu metabolismul aminoacizilor sulfurați) (7).

dului propionic (14, 53) (fig. XXII.3), a cărei blocare ar fi răspunzătoare de leziunile neurologice din deficitul de vitamină B_{12} prin tulburări în sinteza mielinei (22) și se traduce prin eliminarea urinară crescută de acid metilmalonic;

b) *metil-cobalamina*, ca transportor de radicali metil în diferite reacții de sinteză, din care la om a fost demonstrată numai intervenția în reacția de metilare a homocisteinei (în cadrul uneia din căile de sinteză a

metioninei) (fig. XXII.4); donatorul de grupări metil fiind metil-tetrahidrofolatul, această reacție este totodată singura cale de „regenerare" a acidului tetrahidrofolic (FH_4), din forma metil-FH_4 ceea ce oferă explicația acceptată astăzi a megaloblastozei din deficitul de vitamină B_{12} (teoria „capcanei metil-folatului") (29, 48).

Un alt derivat important pentru tratament este *hidroxocobalamina*, la care un radical hidroxil este substituit grupării — CN. Acest derivat pare

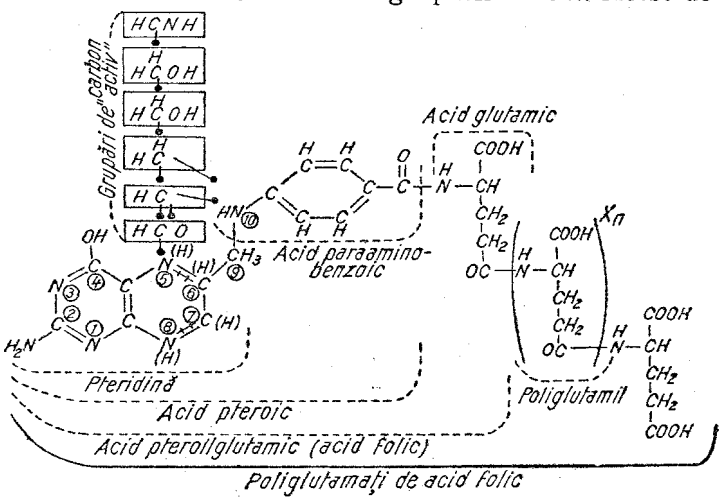


Fig. XXII.4. — Structura acidului folic și a derivaților săi. Sunt figurate cele trei elemente structurale de bază și modul de polimerizare a radicalilor glutamil, formarea acidului tetrahidrofolic prin desființarea a două duble legături (între C_5—C_6 și C_7—C_8) și formarea coenzimelor folice prin atașarea la acestea a unor radicali cu „carbon activ" (de jos în sus: formil, metenil, metilen, metil, hidroximetil, formimino).

să corespundă formei naturale de depozitare a vitaminei B_{12}. După administrare intramuscular, hidroxocobalamina se fixează mai repede și mai puternic pe proteinele serice și pe cele tisulare, procese care fac ca eliminarea urinară să fie mai lentă, ceea ce constituie un avantaj în plus pentru utilizarea hidroxocobalaminei în terapia anemiei Biermer.

Există dovezi pentru intervenția vitaminei B_{12} și la alte niveluri ale metabolismului folaților, ca transportul intracelular al acestora (24, 66) și sinteza poliglutamaților în celule (51, 52), precum și al enzimei timidilat sintetaza (27).

Deși reacția de reducție a ribonucleotidelor în dezoxiribonucleotide (esențială pentru sinteza de ADN) nu este dependentă, la om, de vitamina B_{12}, totuși adaosul de timidină în culturi celulare poate converti megaloblaștii în celule normale numai în cazul deficitului de acid folic, nu însă și în cel de vitamină B_{12}.

Interrelațiile metabolice ale vitaminei B_{12} (implicit și teoria „capcanei metil-folatului") au fost supuse în ultimul deceniu unor reevaluări importante, în special pe baza datelor experimentale obținute prin inactivarea vitaminei B_{12} cu oxid nitros (14, 19a). Metil-folatul, forma redusă spre care tind reacțiile de interconversie a coenzimelor folice este donatorul principal de grupări metil pentru sinteza metioni-

nei, dar şi pentru sinteza unor amine biogene, ceea ce implică însă o reoxidare a grupării metil printr-o inversare a reacţiei mediate de metil-tetrahidrofolat reductază (v. fig. XXII.5) sub influenţa creşterii nivelului de metionină; scăderea acesteia (caracteristică deficitului de vitamină B_{12}) deplasează dinamica reacţiei în sens contrar, accentuând deci acumularea de metil-folat. Experimental, administrarea de metionină în deficitul de vitamină B_{12} ameliorează multe din efectele acestuia, ducând la creşterea poliglutamaţilor intracelulari cu scăderea proporţiei formelor metil-FH_4, scăderea eliminării urinare de acid formiminoglutamic ş.a. După o altă ipoteză (15), tulburarea de bază în deficitul de vitamină B_{12} ar fi sinteza scăzută a metioninei (dependentă de metionin sintetază), principala furnizoare de unităţi de „carbon activ" pentru sinteza formiatului, formil-FH_4 fiind coenzima folică din care derivă prin reacţii de interconversie toate celelalte. Alte ipoteze, între care şi cele privind bazele biochimice ale leziunilor neurologice din deficitul de vitamină B_{12}, nu au putut fi satisfăcător demonstrate.

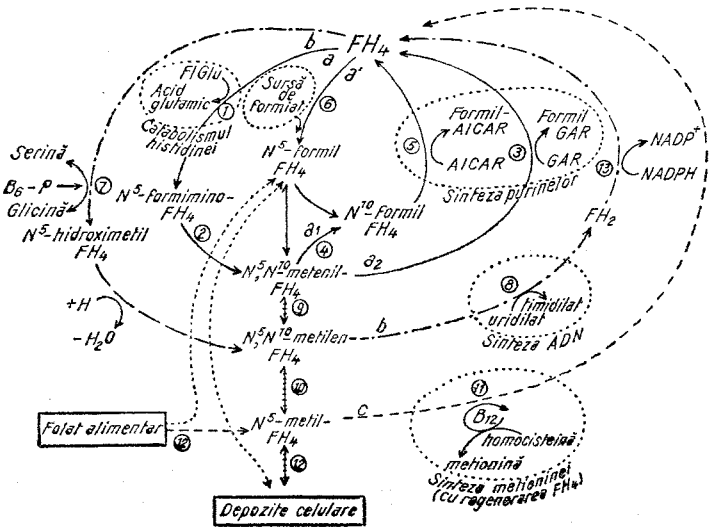


Fig. XXII.5. — Schema circuitelor metabolice ale folaţilor (modificată după Nyström, 1969).

Sunt figurate: un circuit al „sintezei purinelor" (a, a'), circuitul „sintezei ADN" (b) şi cel al „sintezei metioninei" cu „regenerarea folatului activ" (c); circuitele alimentate din depozitele celulare şi din aportul exogen de folaţi sunt legate între ele prin reacţii de interconversie cu tendinţă de gravitare către forma metil-FH_4; sunt arătate principalele reacţii de transfer şi interconversie, cu enzimele respective.

Enzime: 1 — formimino-transferaza; *2* — ciclo-dezaminaza; *3* — GAR-transformilaza; *4* — ciclohidrolaza; *5* — AIGAR-transformilaza; *6* — enzimă activatoare de formiat; *7* — serin-hidroximetil-transferaza; *8* — timidilat-sintetaza; *9* — N^5,N^{10}-metilen-FH_4-dihidrogenaza; *10* — N^5,N^{10}-metilen-FH_4-reductaza; *11* — vitamina B_{12}-transamilaza; *12* — conjugaze; *13* — FH_2-reductaza.

Vitamina B_{12}, este sintetizată de către o serie de microorganisme cu largă răspândire în natură, inclusiv în tubul digestiv al animalelor (mai ales la rumegătoare), de unde vitamina ajunge în ficat, muşchi, glande, lapte, ouă. În special rinichiul şi ficatul conţin multă vitamină B_{12} (150—200 μg/100 g).

Din aportul alimentar mediu de 3—20 μg pe zi (în funcție de calitatea dietei) se absorb 1—5 μg vitamină B_{12}. Din stocul total al organismului de aproximativ 3 g, din care circa 1 500 mg sunt depozitate în ficat, se pierde zilnic (prin intestin) cam 0,1% sau mai mult, cantitate care echivalează deci cu necesitățile zilnice, care sunt de 1—5 μg. Acestea cresc în cursul sarcinii, în diferite stări hipermetabolice, în perioada de dezvoltare etc. și pot prezenta variații individuale.

Absorbția vitaminei B_{12} la om este condiționată de prezența *factorului intrinsec* (F.I.), o glicoproteină (dimer cu GM de 115 000 d) (26, 31) secretată de celulele parietale gastrice din regiunea fundică, ce leagă cu mare afinitate vitamina B_{12} eliberată prin digestie.

În activitatea F.I. a fost deosebită o acțiune de favorizare a absorbției vitaminei B_{12}, caracteristică, și o funcție de fixare a vitaminei B_{12}, nespecifică, deoarece și alte substanțe din tubul digestiv fixează vitamina B_{12}.

Cantitățile mici (în jur de 1 μg) sunt absorbite în proporție de circa 70%, proporția scăzând pentru cantități mai mari.

În stomac vitamina B_{12} mai este fixată, cu o mare afinitate, în special la un pH acid și de o altă proteină de proveniență salivară, proteina R sau cobalofilina. O parte din vitamina B_{12} fixată de proteina R este secretată în bilă și ajunge astfel în duoden. Complexele vitamină B_{12}-proteină R salivară sau biliară sunt degradate în duoden de proteazele pancreatice și vitamina B_{12} liberă este fixată de factorul intrinsec, traversând astfel intestinul subțire până în ileonul terminal.

Complexul vitamină B_{12}-F.I. se atașează la nivelul celulelor mucoasei de receptori specifici, în prezența ionilor de Ca^{2+} sau Mg^{2+} la pH alcalin și se absoarbe la acest nivel. Secreția pancreatică favorizează absorbția vitaminei B_{12} probabil prin degradarea „proteinelor R", care leagă și ele aproximativ 1/5 din vitamina B_{12} alimentară (2).

Afecțiuni ale ileonului terminal, ca și scurtcircuitarea sa (fistule gastro- sau jejunocolice, sau excludere chirurgicală) fac imposibilă absorbția vitaminei B_{12} și duc la deficitul de vitamină B_{12}. Absorbția prin mucoasa colică este atât de mică încât cantitatea mare de vitamină B_{12} sintetizată de flora din colon nu poate acoperi nevoile zilnice, ceea ce face ca subiecții să fie dependenți de aportul alimentar de vitamină B_{12}.

Transportul plasmatic al vitaminei B_{12} este asigurat de transcobalamine TC-I, II, III. Din acestea numai TC II este adevărata proteină transportoare (parțial saturată și cu *clearance* și *turnover* rapid) (53), care leagă aproape integral vitamina B_{12} absorbită și o transportă în tot corpul la receptori ai membranelor celulare; de aici, după endocitoză și degradare proteolitică în lizosomi a complexului TC II-B_{12}, vitamina ajunge în parte la mitocondrii, este convertită în forme coenzimatice și reapare în plasmă. Cea mai mare parte din vitamina B_{12} circulantă este fixată de cobalofilină care se mai găsește și în salivă, secreții gastrice și intestinale, lacrimi și spermă.

TC I (cu *turnover* lent, complet saturată) pare a fi mai degrabă fracțiunea plasmatică a unei proteine de depozit; de origine probabil granulocitară (59), ea crește foarte mult în leucemia granulocitară cronică (cu niveluri corespunzătoare

de vitamină B_{12}). O creștere evidentă a TC III (fracțiunea nesaturată) se constată în policitemia vera, precum și în leucocitoze de diferite cauze; creșterea capacității plasmatice de saturare cu vitamină B_{12}, constatată în leucemiile acute și limfoame, se face însă pe seama TC II.

Concentrația serică normală a vitaminei B_{12}, determinată prin măsurarea turbidimetrică a creșterii unor microorganisme dependente de această vitamină, ca *Euglena gracilis* (2) sau *Lactobacillus leichmanii* (65), sau prin metode de diluție radioizotopică (43), se consideră a fi situată între 200 și 900 pg/ml (în cea mai mare parte sub formă de metil-cobalamină); valorile sub 100 pg/ml sunt patologice și coincid cu transformarea megaloblastică a măduvei.

Clasificarea fiziopatologică a deficitului de vitamină B_{12}. În tabelul 22.I situațiile în care poate apărea deficitul de vitamină B_{12} (cu frecvență variabilă și în grade diferite) sunt grupate după mecanismele fiziopatologice principale care le stau la bază. Se distinge un deficit cantitativ (absolut sau relativ), în care cantitatea de vitamină ajunsă în organism este insuficientă pentru acoperirea necesităților normale (în primul caz) sau crescute (în cazul al doilea), și un deficit de utilizare, în care vitamina, deși prezentă, nu poate participa la reacțiile biochimice specifice.

Datorită rezervelor celulare relativ mari față de necesitățile zilnice, epuizarea stocurilor de vitamină B_{12} apare târziu, sub influența unor factori patogenetici persistenți. De aceea anemiile megaloblastice prin aport alimentar scăzut sau consum crescut apar mult mai rar decât în cazul deficitului folic. Categoria patogenetică cea mai importantă în deficitul de vitamină B_{12} este cea a tulburărilor de absorbție, locul proeminent revenind maladiei Addison-Biermer.

Semnele clinice și de laborator proprii deficitului de vitamină B_{12} sunt anemia megaloblastică corectabilă cu vitamina B_{12}, neuropatia prin alterarea substanței mielinice, scăderea vitaminei B_{12} în ser și eliminarea urinară crescută de acid metilmalonic.

FORMELE ETIOPATOGENICE ȘI CLINICE ALE DEFICITULUI DE VITAMINĂ B_{12}

BOALA ADDISON-BIERMER

Numită altădată și „anemia pernicioasă", este forma cea mai frecventă și mai bine studiată a deficitului de vitamină B_{12}.

Definiție. Boala Addison-Biermer este o afecțiune cronică caracterizată prin anemie cu modificări megaloblastice ale celulelor din sângele periferic și măduva osoasă, leziuni degenerative ale mucoasei tractului digestiv și la nivelul sistemului nervos, datorită absorbției intestinale deficitare a vitaminei B_{12} prin lipsa factorului intrinsec, instalată probabil printr-un mecanism autoimun pe un fond constituțional particular.

Clasificarea fiziopatologică a deficitului de vitamină B_{12}

Natura deficitului	Mecanism fiziopatologic		Situații clinice
1	2		3
A. *Deficit cantitativ* 1) absolut	a) inhibiție metabolică a sintezei de ADN		metotrexat, 6-mercaptopurină, azathioprină, 5-fluorouracil, hidroxiuree, citosinarabinosid
	b) aport insuficient		malnutriție severă prelungită; regimuri vegetariene absolute
	c) eliberare insuficientă din complexe proteice (proteine R)		sindroame de maldigestie din insuficiența pancreatică (gastro-enteroanastomoze, boli intestinale etc.)
	d) consum în intestin	1) prin proliferare bacteriană	diverticuli intestinali, anastomoze, fistule, anse excluse, stricturi, aclorhidrie etc.
		2) prin paraziți intestinali	infestare cu botriocefal
	e) absorbție intestinală insuficientă	1) lipsa factorului intrinsec a) prin defect genetic	deficit congenital de F.I. (F.I. absent sau deficitar funcțional)
		b) prin mecanism autoimun	boala Addison-Biermer; unele forme de A.P. „juvenilă"
		c) prin eliminarea substratului secretor	rezecție gastrică totală (sau parțială); gastrite ale bontului, gastrite atrofice, după substanțe corozive, cancere gastrice etc.
		2) deficit de fixare a complexului F.I.-B_{12} pe receptorii ileali a) prin defect genetic	sindromul Immerslund
		b) prin pH scăzut	insuficiență pancreatică; sindromul Zollinger-Ellison
		3) afectarea transportului transcelular	

TABELUL 22.I (Continuare)

1	2		3
		a) prin leziuni infracelulare	alcoolism, iradiere, administrare de PAS, colchicină, neomicină: deficit de acid folic; (posibil şi în sindromul Imerslund)
		b) prin leziuni histologice	boli cu afectarea ileonului terminal (enteropatia glutenică, sprue, boala Crohn, limfoame, tuberculoză etc.)
		c) prin ablaţie intestinală	rezecţii de ileon
2) relativ	a) consum crescut		sarcină, hipertiroidie, hematopoieză hiperactivă, boli proliferative, mielom (?)
	b) eliminări crescute (?)		(posibil în leziuni hepatocelulare)
B. *Deficit de utilizare*	a) deficit de transport plasmatic		deficit (genetic) al transcobalaminei II; TC II anormală
	b) deficit de fixare şi depozitare (?)		în ciroza hepatică
	c) blocare a reacţiilor enzimatice	1) prin defecte enzimatice congenitale	deficit de metilmalonil-CoA mutază, deficit de CH_3—FH_4 homocistein transferază ş.a.
		2) prin analogi structurali ai vitaminei B_{12}	(experimental): cobaloxime, derivaţi cu substituiri amidice şi anilidice

Istoric. În 1849 Addison descrie o anemie „idiopatică" la persoane bine nutrite; în perioada 1868—1872, Biermer face descrierea anatomoclinică devenită clasică a „anemiei pernicioase". Leziunile degenerative gastrice, presupuse de Flint în 1860, sunt confirmate necroptic de Fenwick (1870), iar aclorhidria, demonstrată de Cohn şi Mehring (1886), este recunoscută ca semn obligator abia după câteva decenii. Diagnosticul morfologic, iniţiat de descrierea megaloblastului de către Ehrlich (1908), ajunge la dezvoltarea deplină prin practica punctiilor medulare (după 1925). Etapa terapeutică, ce a dus şi la elucidarea etiopatogeniei bolii, începe cu Murphy (1926) prin hepatoterapia orală, fiind urmată de prepararea unor extracte hepatice purificate, izolarea vitaminei B_{12} (Rickesi şi colab. şi Lester-Smith, 1948), determinarea structurii şi sinteza ei (Hodgkin, 1973).

Pe de altă parte, în 1945, Spies şi colab. au arătat că modificările megaloblastice şi celelalte manifestări ale anemiei Biermer — cu excepţia celor nervoase — pot fi înlăturate prin acid folic. Descoperirea de către Castle (1938) a „factorului intrinsec" elucidează în parte patogeneza acestei boli. Cercetările ultimilor ani au adus numeroase date referitoare la aspectele imunologice, genetice şi metabolice ale bolii.

Epidemiologie. Frecvența bolii variază după regiuni geografice, fiind mult mai mare (până la 0,13% din populație) în țările populate de „rase nordice" (Olanda, Țările Scandinave, S.U.A., Canada) decât în sudul și estul Europei și foarte redusă în Extremul Orient și la negri; date mai recente (11) tind să atenueze totuși aceste diferențe. Frecvența mai mare la sexul feminin (5 : 2) nu este confirmată de toți autorii. Pe grupe de vârstă, frecvența maximă se înregistrează între 45 și 55 de ani, dar procentual creșterea continuă în grupele următoare. Condițiile economice și profesionale nu influențează semnificativ frecvența bolii.

Etiopatogenie. Elementul patogenic fundamental este deficitul de absorbție a vitaminei B_{12} alimentare („factorul extrinsec" al lui Castle, 1938), în absența factorului intrinsec, care (în forma comună a bolii) este legată de gastrita atrofică. Studii privind frecvența familială a bolii (sau a unor simptome ale ei) ridică problema neelucidată încă, a interrelației gastrită — factor imunologic — factor genetic.

Dacă în forma congenitală a bolii (apărută la vârsta tânără, fără leziuni de gastrită sau anticorpi anti-F.I.) transmiterea ereditară (ca un caracter autosomal-recesiv) este evidentă, în forma comună a bolii situația este mult mai complexă, sugerând un determinism poligenic, în manifestarea căruia intervin factori extragenetici, cu pondere variabilă.

Rolul constituției și al eredității a fost observat încă de la descrierea primelor cazuri; ulterior, s-au presupus corelații cu anumite constituții somatice, tipuri de sistem nervos și endocrin, unele particularități ale feței, părului etc.

Mai importantă este constatarea frecvenței crescute în familiile bolnavilor a maladiei complet constituite (în 9% din cazuri) sau a manifestărilor ei parțiale (în 15% din cazuri, ca forme fruste sau incipiente de boală) (7), simptomele mai des întâlnite între rudele bolnavilor fiind hipo- sau anaciditatea (19%, însoțită de absorbție redusă și la niveluri serice scăzute de vitamină B_{12}), tulburări gastrointestinale (33%), colecistopatii, modificări linguale (8%), parestezii (25%). S-a mai observat că în unele familii boala apărea cu neuropatie, în altele fără. Dintre modificările hematologice au fost semnalate macrocitoza, ovalocitoza, hipersegmentarea (23%). Deosebit de importantă este prezența în circulație a anticorpilor anticelulă parietală la rudele bolnavilor în proporție de 24% din cazuri (față de 3,8% în populația generală).

Rolul *gastritei* în patogenia bolii nu este nici astăzi bine elucidat. De etiologie complexă (în care intră și factori constituționali), cu frecvență mare în populație, tendință de agravare în timp, putând ajunge la insuficiență secretorie, gastrita apare ca o cauză primară posibilă a anemiei megaloblastice, fără să ducă obligator la simptomatologia completă a bolii. După o altă interpretare, în această boală factorii genetici contribuie, eventual prin intermediul celor imunologici, la constituirea gastritei.

Rolul *factorilor imunologici* este sugerat în primul rând de prezența de anticorpi autoimuni în serul bolnavilor. Anticorpii cu specificitate pentru antigene din celula parietală gastrică (Atc anti-CP) sunt prezenți în proporție de aproape 90% din cazuri, fiind decelați însă și în cazuri cu gastrita atrofică simplă (50%) sau chiar la subiecți aparent sănătoși

(5—8%), precum și la pacienții cu boli autoimune tiroidiene sau suprarenale (12). Autoantigenii din celulele parietale gastrice au fost identificați ca fiind subunitățile α și β ale pompei de protoni (H^+K^+ATPază).

Rolul patogen (citotoxic) al acestor anticorpi a putut fi dovedit recent (1). Prezența lor în gastrite nebiermeriene sugerează posibilitatea apariției lor ca un fenomen secundar alterării structurilor antigenice celulare. Pe de altă parte, prezența lor și împreună cu alte boli autoimune, precum și apariția de anticorpi antitiroidieni în boala Biermer, sugerează prezența unei tulburări genetice manifestate printr-o toleranță imună scăzută față de antigene comune celulei gastrice și altor celule cu origine embriologică ectodermală.

Mai specifici bolii Biermer sunt anticorpii anti-F.I. prezenți în ser la 56% din pacienți (în sucul gastric se pot decela în 75% din cazuri); anticorpii sunt de tip IgG și IgA (cei din ser fiind numai de tip IgG). Rolul lor patogenetic este dovedit cert: ei interferează cu absorbția vitaminei B_{12} fie prin împiedicarea legării vitaminei B_{12} de F.I. („anticorpi blocanți"), fie prin legarea F.I. liber sau a complexului F.I.-B_{12} („anticorpi de legare") (56).

Argumentele pentru existența și a unor tulburări autoimune de tip celular țin de tabloul histologic al gastritei biermeriene cu infiltrație limfoplasmocitară, de pozitivitatea testului de transformare limfocitară (13) și al inhibiției migrării limfocitelor în prezența factorului intrinsec (21), de asocierea cu alte boli autoimune (tiroidită Hashimoto, diabet de tip I ș.a.), pe lângă prezența autoanticorpilor amintiți mai sus. Anemia Biermer este considerată astăzi ca o boală autoimună idiopatică primară specifică de organ.

Tabloul clinic. Debutul bolii este insidios, bolnavul prezentându-se în majoritatea cazurilor, pentru semne de anemie lent progresivă.

Anamneza poate revela simptome variate ținând de cele trei sisteme de organe afectate cu prioritate. Simptomele digestive (inapetență, senzație de plenitudine, vărsături cu gust fad, uneori diaree sau constipație) apar în general precoce; arsuri ale limbii se întâlnesc mai rar. Simptomele de anemie (oboseală, ameteli, palpitații, paloare) se instalează mai târziu. Simptomele nervoase, adesea precoce, interesează mai ales sensibilitatea membrelor (senzația de furnicături, amorțeală etc.); tulburările de mers, dureri fulgurante, uneori manifestări psihotice, apar în general tardiv.

Examenul obiectiv. Tegumentele, lipsite de elasticitate, apar palide (în raport cu gradul anemiei) pe un fond gălbui-citrin, adesea subicterice și infiltrate edematos (aspect palid-gălbui, anemic al bolnavului); mai pot apărea o pigmentare brună pătată, elemente purpurice, tendință la vitiligo și încărunțire precoce. Părul este uscat, fragil, unghiile sfărâmicioase. Pete mici hemoragice pot apărea pe fața de extensie a extremităților, iar uneori se întâlnesc hemoragii retiniene ce pot duce până la orbire.

Examenul *aparatului cardiovascular* poate decela în anemiile mai severe semne de insuficiență cardiacă, ținând de hipoxie cu creșterea debitului cardiac, eventual și de alterarea metabolismului miocardic prin deficit de vitamină B_{12}, sufluri anemice, modificări ECG (turtirea undei T), toate corectabile prin tratament. La nivelul *aparatului genitourinar* se semnalează de regulă urini pleiocrome conținând urobilinogen și alți

pigmenți biliari, mai rar albuminurie, eventuale tulburări micționale în caz de leziuni neurologice grave; este remarcabilă frecvența infecțiilor urinare colibacilare. Splenomegalia se întâlnește în jur de 20% din cazuri și se datorează creșterii sechestrării eritrocitare.

Importante pentru diagnostic sunt modificările la nivelul *aparatului digestiv*. Glosita (descrisă de Hunter), prezentă la mai mult de jumătate din cazuri, începe de regulă pe marginile și la vârful limbii ca roșeață dureroasă și se extinde apoi pe fața dorsală ducând la atrofia papilelor linguale; afectarea mucoasei faringoesofagiene poate realiza sindromul Plummer-Vinson (ca în anemiile feriprive severe). La nivelul stomacului se constată o insuficiență secretorie accentuată cu scădere importantă a cantității de suc gastric, a activității peptice, acidului clorhidric și factorului intrinsec, fără răspuns la stimularea cu histamină, achilia histaminorefractară fiind unul din semnele cele mai constante și precoce, putând preceda cu ani instalarea bolii și duce adesea la popularea bacteriană (în special cu *Escherichia coli)* a stomacului și la tulburări dispeptice (cu tendință mai ales la diaree). Mucoasa gastrică prezintă o atrofie accentuată, vizibilă radiologic și endoscopic în cele 2/3 superioare, cu dispariția tubilor glandulari; celulele epiteliului bucal și gastric apar mai mari, cu cromatină nucleară săracă, citoplasmă vacuolizată. Uneori pe mucoasă apar polipi benigni. Există și o suferință a epiteliului intestinal (aplatizarea celulelor, infiltrate cu celulele rotunde, rărirea glandelor Lieberkühn), care duce, între altele, la o absorbție insuficientă de fier (dar și de lipide, acid folic) și adesea diaree. În unele cazuri pot apărea semnele unei insuficiențe pancreatice sau hepatice ușoare. Ficatul este uneori ușor mărit.

Semnele de suferință a *sistemului nervos* se întâlnesc în circa 30% (cu afectare severă în 7%) din cazuri; ele au la bază alterări ale substanței mielinice (mai ales la nivelul cordoanelor spinale posterioare și laterale, precum și a substanței albe cerebrale), cu degenerare secundară a axonilor (12).

Nu există o corelație între gradul anemiei și leziunile neurologice, acestea putând apărea ca prim semn de boală și evolua chiar fără anemie, iar în alte cazuri putând lipsi complet. Explicația este sugerată de faptul că cele două tulburări țin de circuite metabolice distincte ale vitaminei B_{12}.

Simptomele neurologice precoce sunt paresteziile simetrice la nivelul membrelor (senzații de amorțeală, de curent electric, răceală, constricție; tulburări ale sensibilității profunde, în special alterarea sensibilității vibratorii, rar dureri fulgurante), modificări EEG reversibile prin tratament. Slăbirea motorie este evidentă. Într-un studiu mai avansat apar semne de suferință a cordoanelor posterioare (mers ataxic, alterări ale simțului pozițional) sau a cordoanelor laterale (semn Babinski, hiperreflexie O.T., mers spastic), cu posibile combinații între ele. Scăderea sau abolirea reflexelor, rotuliene și achiliene, uneori și tulburări pupilare, pot sugera un tabes. Mai rar se întâlnește tipul de secțiune transversă a măduvei (cu abolirea sensibilității superficiale și pareză la membrele inferioare, pareză vezicală ș.a.). Se pot întâlni uneori manifestări psihotice de diverse tipuri de la „distonii vegetative", iritabilitate și tulburări de atenție, concentrare și memorie până la depresiuni, parasonia, agitații,

halucinații, manii, epilepsie, demență, reversibile prin tratament și (rar) leziuni de nervi periferici sau cranieni (atrofia nervului optic). Uneori pot apărea incontinență urinară și fecală, impotență ca și tendință la sinucidere.

O ascensiune termică este adesea prezentă (febră „anemică"), putând ajunge în formele medii sau severe la 37^5—38^5.

Examene de laborator. *Modificări sanguine.* Anemia este de grad variabil, elementul cel mai pregnant fiind macrocitoza; majoritatea hematiilor sunt mari (până la 12 μ sau mai mult), ușor ovalare, bine încărcate cu hemoglobină (fără zonă centrală clară), dar există și eritrocite mici (chiar sub 5 μ), unele cu forme neregulate (anizocitoză cu poikilocitoză). Ca urmare, constantele eritrocitare sunt crescute (DEM: 8—9 μ sau mai mult; VEM: 95—110 μ^3, uneori chiar 140 μ^3; HEM: 33—38 pg, uneori 50 pg), iar valorile hematocritului și hemoglobinei apar mai puțin scăzute decât cifra de eritrocite. Un semn inconstant, dar important pentru diagnostic, este prezența în sânge a câtorva megaloblaști. Numărul de reticulocite este scăzut.

Tabloul leucocitar se caracterizează prin leucopenie, în general moderată (3 000—5 000/mm^3), granulocite mai mari, cu tendință la hipersegmentare a nucleului; uneori apar și elemente mai tinere (metamielocite, mielocite). Trombocitele sunt scăzute moderat (rareori sub 50 000/mm^3), cu anizocitoză și câteodată trombocite gigante; uneori ele sunt ușor deficiente funcțional.

Caracteristicile generale ale *tabloului medular* constau în densitate celulară mare cu creșterea raportului E : G, transformare megaloblastică a morfologiei celulare normale (talie celulară crescută cu scăderea raportului nucleocitoplasmatic și asincronism de maturare), creșterea numărului de mitoze, anomalii ale acestora. Esențial este faptul că aceste modificări apar în grade diferite (de la modificări megaloblastice „minore" sau incipiente) în unele celule, până la transformarea megaloblastică totală și intensă, cu anomalii celulare extreme („măduvă albastră", datorită predominanței megaloblaștilor cu citoplasmă bazofilă).

Promegaloblastul (20—30 μ) are un nucleu voluminos situat puțin excentric, cu structură cromatiniană fin perlată, câțiva nucleoli mari, albaștri; citoplasma, intens bazofilă, are o zonă perinucleară mai clară care poate persista și în stadiile ulterioare. În stadiul de megaloblast bazofil nucleul, mai mic, fără nucleoli, are cromatina mai densă, dar fără grămezile caracteristice normoblastului bazofil. La megaloblastul policromatofil apare cel mai evident asincronismul de maturație între nucleu (încă mare, cu cromatina care abia începe să formeze blocuri) și citoplasmă (întinsă, policromatofilă, adesea cu corpi Jolly). Megaloblastul oxifil (10—18μ) are citoplasma complet oxifilă, structură cromatiniană încă perceptibilă.

În seria granulocitară tulburările de maturație apar cel mai evident la nivelul metamielocitelor „gigante" (cu dimensiuni chiar până la 80 μ) și a nesegmentatelor, în care cromatina nucleară foarte săracă contrastează cu forma nucleului, citoplasma fiind încă bazofilă. Există o tendință de hipersegmentare nucleară, care duce la formarea unor granulocite cu 6—8 sau chiar mai mulți lobi (cu cromatină totuși săracă).

În seria megacariocitară pot apărea elemente cu talie mai mare și granulare deficitară; caracteristică este însă accentuarea tendinței naturale de segmentare a nucleului, cu apariția de segmente detașate, aspecte „în ciorchine", „megacariocite explodate".

În măduvă se găsește de asemenea o creștere a celulelor reticulare și adesea numeroase limfocite.

În cursul tratamentului cu vitamina B_{12}, odată cu creşterea producerii de eritrocite normale, care are ca efect o scădere a rezervelor de fier, poate apărea o hiposideremie; în această fază de concomitenţă a deficitului de vitamină B_{12} (încă prezent) cu hiposideremia, tabloul medular poate apărea „dimorf", cu prezenţa de semne morfologice proprii fiecăreia din cele două tulburări.

Modificări ale unor *constante biologice* cu oarecare valoare în orientarea diagnosticului şi tratamentului sunt creşterea bilirubinei, în special a celei neconjugate (de provenienţă mai ales medulară), nivelul seric crescut al unor enzime ca lactico-dehidrogenaza (LDH), malic-6-fosfogluconat-DH şi 2-hidroxibutirat-DH, scăderea haptoglobinei (datorită hemolizei), sideremie crescută cu scăderea CTLFe şi scăderea absorbţiei intestinale de fier. Uneori producţia de protrombină şi de proconvertină este scăzută. Viteza de sedimentare a eritrocitelor este accelerată, dar scade repede după tratament. În circa 50% din cazuri se găsesc anticorpi serici anti-F.I.

Utilizarea testelor privind metabolismul vitaminei B_{12} va fi discutată la diagnosticul anemiilor megaloblastice.

Diagnosticul pozitiv, suspectat pe baza datelor clinice, este stabilit prin constatarea semnelor de anemie megaloblastică cu achilie refractară la histamină şi verificat prin răspunsul prompt la tratamentul cu vitamină B_{12}. Cercetarea absorbţiei intestinale (prin testul Schilling) se utilizează pentru confirmarea lipsei F.I., mai ales în cazurile tratate sau cu simptomatologie incompletă; determinarea vitaminei B_{12} în ser (şi eventual a AMM în urină) ar putea fi rezervată pentru cazurile mai greu de elucidat (de exemplu o simptomatologie suspectă fără anemie). Determinări speciale pentru dozarea F.I. şi cercetarea anticorpilor anti-F.I. în sucul gastric şi în ser sunt foarte rar utilizate în practica clinică. Dificultăţi pot apărea în cazurile de boală Biermer neinvestigate corect, etichetate ca „anemii simple" şi tratate empiric şi inadecvat cu fier şi vitamina B_{12} sau acid folic; în aceste cazuri aspectul sanguin periferic şi medular modificat de tratamentul administrat poate îngreuia şi întârzia precizarea diagnosticului.

Diagnosticul diferenţial urmează a fi discutat în cadrul general al anemiilor megaloblastice.

Evoluţie, forme clinice, prognostic. Introducerea terapiei specifice a schimbat radical prognosticul bolii, altădată fatal. Totuşi, deşi cazurile cu anemie extremă şi leziuni neurologice grave descrise de vechii clinicieni se întâlnesc astăzi mult mai rar, există încă un număr de bătrâni la care boala este ignorată şi care mor cu diagnostic de „caşexie senilă" sau suspiciune de cancer gastric. De asemenea, într-un număr de cazuri în care tulburările neurologice preced sau domină multă vreme tabloul clinic anemic, se ajunge la leziuni nervoase ireversibile din cauza întârzierii instituirii tratamentului specific. Diagnosticul poate fi deseori omis în formele incipiente cu simptomatologie hematologică frustă, simptome nervoase şi digestive vagi, mai ales dacă au fost tratate anterior cu polivitamine (conţinând şi acid folic). S-au descris şi forme latente, cu scădere progresivă a vitaminemiei, multă vreme asimptomatice.

Asocieri cu alte boli. Asocierea cu cancerul gastric este întâlnită în 7—12% din cazuri (frecvenţă de circa 3 ori mai mare decât în populaţia martor) (12), iar cu polipoza gastrică în circa 6% din cazuri; apariţia unor simptome suspecte şi examenele radiologice de control, periodice, contribuie la depistarea lor precoce. Alte asocieri au fost amintite la prezentarea etiopatogenezei.

Tratament. În prezent, după obținerea prin sinteză a vitaminei B_{12}, tratamentul bolii Addison-Biermer se face aproape exclusiv prin administrarea de vitamină B_{12}, în cantități și moduri care să asigure refacerea și menținerea stocurilor normale ale organismului.

Administrarea orală în doze mari (200—500 μg/zi) este grevată de costul ridicat al tratamentului și de factori de incertitudine. Administrarea în asociere cu factor intrinsec (preparate de tip Bifacton) are dezavantajul pierderii eficacității după câțiva ani datorită formării de anticorpi anti-F.I. heterolog (preparat din mucoasă gastrică de porc).

Calea parenterală, cea mai eficace și comodă, urmărește refacerea rapidă a stocurilor de vitamină B_{12}, utilizând doze potrivite cu capacitatea de retenție a organismului.

Eficacitatea creșterii dozelor administrate este anulată parțial de scăderea procentului de retenție a lor; astfel, pentru doze unice de 50, 100 sau 1 000 μg ciancobalamină, retenția în organism după 48 de ore este de 90, 45, respectiv 15%, restul eliminându-se prin urină, pierderile continuând și în zilele următoare în proporții tot mai mici (48). În bolile hepatice, retenția vitaminei poate scădea la jumătate din valorile normale.

În forma obișnuită de boală (69), se administrează 100 μg vitamină B_{12} pe zi i.m., timp de 2 săptămâni, apoi aceeași doză de 2 ori pe săptămână în următoarele 4 săptămâni (sau până la normalizarea valorilor de hemoglobină) și ulterior câte 100 μg pe lună în tot cursul vieții, fapt pentru care pacientul trebuie să fie bine informat. În formele cu neuropatie, se utilizează scheme intensive: 1 000 μg la 2—3 zile în cura de atac, timp de câteva săptămâni, și ulterior câte 100 μg de 1—2 ori pe săptămână timp de 6—12 luni, în funcție de rezultate. Unele forme cu neuropatii severe au putut fi ameliorate prin administrare intrarahidiană de vitamină B_{12} (1 000 μg de 2—4 ori pe an) (28).

Hidroxocobalamina are, datorită fixării mai puternice de proteinele tisulare și transportorii plasmatici, avantajul de a realiza o creștere mai persistentă a vitaminemiei, putând fi administrată la intervale mai mari (500 μg la 6—8 săptămâni) (9), mai ales în cura de întreținere, și este preferată de unii în tratamentul neuropatiei. Existența unor cazuri cu scădere precoce a vitaminemiei după oricare din formele de vitamină B_{12} limitează aceste avantaje.

Administrarea de acid folic (împreună cu vitamina B_{12}) se face în cazurile cu deficit concomitent de folați; administrat singur, el poate induce o remisiune hematologică parțială, dar agravează sau precipită instalarea sindromului neurologic prin scăderea vitaminei B_{12}.

Administrarea de glicocorticosteroizi a dus în câteva cazuri la creșterea tranzitorie a absorbției de vitamină B_{12} și chiar la ameliorarea leziunilor mucoasei gastrice.

Dat fiind că rezervele de fier ale acestor bolnavi sunt de regulă scăzute și că în cursul hematopoiezei accelerate sub tratamentul cu vitamină B_{12} se poate ajunge la o epuizare a acestora, cu blocarea remisiunii datorită sideropeniei, tratamentul cu fier este recomandabil (de regulă, când se ajunge la 8—9 g Hb/100 ml), la început cu preparate injectabile, apoi peroral cu adaos de acid clorhidric.

Administrarea de preparate cu acid clorhidric, precum și de fermenți digestivi este indicată și în caz de persistență a tulburărilor dispeptice după obținerea remisiunii.

Transfuziile de sânge (masă eritrocitară) pot fi necesare în cazurile cu hipoxie anemică severă, concomitent cu tratamentul specific.

Este, de asemenea, important tratamentul adecvat al bolilor asociate și al complicațiilor (insuficiență cardiacă, infecții ș.a.).

Efectele tratamentului cu vitamina B_{12} se instalează rapid. În măduvă, reversia megaloblaștilor în normoblaști se observă chiar din primele ore. În sângele periferic are loc creșterea rapidă a cifrei de reticulocite, atingând valori maxime între 6 și 9 zile („criza reticulocitară", cu atât mai intensă, cu cât cifra inițială de hemoglobină a fost mai scăzută); pe frotiul de sânge se observă și numeroase eritrocite policromatofile; ulterior, morfologia sângelui se normalizează treptat prin dispariția macromegalocitelor și poikilocitelor, iar valorile de Hb și Ht revin la normal. În seriile granulocitară și megacariocitară se observă modificări asemănătoare, cu normalizarea celulelor precursoare în măduvă, corectarea trombo- și granulocitopeniei, uneori o adevărată „criză granulocitară" (chiar cu aspect de reacție leucemoidă); hipersegmentarea persistă însă mai mult timp.

Dintre modificările constantelor biologice sunt de semnalat scăderea precoce a sideremiei și folatemiei sub valorile normale, cu tendință ulterioară de normalizare, apoi normalizarea valorilor serice de bilirubină, LDH, a eliminărilor urinare de AMM, urobilinogen ș.a.

Din simptomele clinice, inapetența și starea generală se ameliorează rapid, apoi durerile la nivelul limbii, uneori constatându-se chiar regenerarea papilelor linguale. Reversibilitatea manifestărilor nervoase depinde în primul rând de vechimea lor, cele cu durată până la 3 luni fiind potențial reversibile, cu condiția unei terapii optime, de lungă durată; leziunile care persistă după 6 luni de tratament sunt în general ireversibile. Leziunile degenerative avansate ale mucoasei gastrice nu sunt influențate de tratament.

Supravegherea tratamentului este importantă din mai multe puncte de vedere. Un răspuns prompt, complet și durabil este o confirmare în plus a diagnosticului, pe câtă vreme un răspuns întârziat și incomplet obligă la cercetarea prezenței unor factori intercurenți (ca de exemplu infecția, sideropenia, particularități metabolice individuale) sau uneori chiar la reconsiderări diagnostice. Reexaminările periodice ulterioare permit controlul administrării regulate a tratamentului și verificarea eficienței dozelor și ritmului de administrare în menținerea nivelului vitaminic necesar pentru prevenirea recăderilor, lucru deosebit de important la bolnavii cu neuropatie (care se poate agrava și fără semne hematologice de recădere). De asemenea, se pot sesiza modificări în simptomatologia clinică sugestive pentru unele complicații tardive ca polipoza sau cancerul gastric, alte boli autoimune (între care și purpura trombocitopenică autoimună — după observațiile noastre), leucemia limfocitară cronică ș.a. Termenele acestor examinări de control și investigațiile necesare (pe lângă hemograma de rutină) sunt variabile în funcție de particularitățile fiecărui om.

Anemia pernicioasă juvenilă cuprinde cel puțin două entități nosologice diferite: una caracterizată prin lipsa congenitală de F.I. [fără modificări gastrice sau anticorpi anti-F.I. (53), întâlnită uneori la mai mulți frați într-o familie, de unde — importanța determinării F.I. în sucul gastric, chiar pentru depistarea purtătorilor (43 a)] și alta (foarte rară) asemănătoare anemiei Biermer adevărate, apărând însă la vârsta tânără (10—18 ani) (42), sau chiar la copii mici (prin deficit matern preexistent?), cu leziuni neurologice corectate cu vitamină B_{12} (19 a).

Anemia megaloblastică după rezecții gastrice apare rar în comparație cu frecvența mult mai mare a anemiei feriprive. În rezecțiile totale sau subtotale se produce în absența factorului intrinsec o depleție treptată a stocurilor de vitamină B_{12}, cu instalarea anemiei megaloblastice după un interval variabil (de regulă peste 4 ani) (12), în funcție de rezervele de vitamină și de cantitatea de F.I. restantă. După rezecțiile parțiale anemia megaloblastică apare rar, însă se poate constata scăderea vitaminemiei B_{12} și uneori apariția de megaloblaști intermediari în măduvă, probabil datorită atrofiei mucoasei bontului gastric prin sideropenie. În cadrul malabsorbției după gastrectomie poate apărea și un deficit folic.

Anemiile megaloblastice în afecțiunile gastrice primitive, spre deosebire de cele feriprive, apar foarte rar; s-au semnalat cazuri în carcinoame, lues gastric, ingestie de substanțe corozive.

Deficitul de vitamină B_{12} în bolile intestinale. În aceste boli tulburările de absorbție a vitaminei B_{12} sunt în general mai puțin importante decât ale acidului folic (cu care se pot asocia uneori, ca în sprue, enteropatia glutenică) și sunt corelate în special cu afectarea ileonului (ca în boala Crohn, rezecțiile de ileon ș.a.). Există și o malabsorbție selectivă de vitamină B_{12} determinată genetic [*sindromul Immerslund,* boală rară, cu transmitere autosomal-recesivă (ambii părinți putând avea testul Schilling la limita normală inferioară /71/), însoțită de proteinurie, eventual și alte defecte genetice], în care mucoasa gastrică și intestinală, precum și secreția de F.I., sunt normale; se manifestă în copilărie, foarte rar mai târziu (71). Absorbția vitaminei B_{12} mai poate fi inhibată de unele medicamente (PAS, colchicină ș.a.), de alcool, de iradiere, de deficitul folic.

Un consum crescut de vitamină B_{12} în intestin se întâlnește în proliferările bacteriene care însoțesc stricturi, fistule intestinale, anastomoze cu anse excluse, diverticuli etc.; anemiile megaloblastice care pot apărea uneori în aceste condiții sunt curabile cu antibiotice sau după corecție chirurgicală. În infestarea cu botriocefal (frecventă pe litoralul Mării Baltice la populația consumatoare de pește), anemia megaloblastică este întâlnită la 1—2% din cei infestați (în funcție de numărul și locul de fixare a paraziților, eventual și de o predispoziție genetică) și este caracterizată prin vitaminemie scăzută, test Schilling fals pozitiv (prin captare de către parazit a dozei radioactive).

Consum endogen crescut de vitamină B_{12} există în sarcină, anemii hemolitice, hipertiroidie etc., dar numai rar se ajunge la epuizarea rezervelor de vitamină B_{12}; anemiile megaloblastice apărute în aceste condiții se datorează aproape întotdeauna deficitului de acid folic.

Aportul scăzut de vitamină B_{12} nu duce la anemie megaloblastică decât în cazul regimurilor vegetariene stricte (ca la unele secte religioase); anemia, în general uşoară, este însoţită de regulă de neuropatie şi frecvent de sideropenie (4).

ANEMII MEGALOBLASTICE PRIN TULBURARI DE TRANSPORT ŞI UTILIZARE A VITAMINEI B_{12}

Absenţa transcobalaminei II în ser [tulburare genetică de tip autosomal recesiv (26 a, 26 b)] se caracterizează prin anemie megaloblastică cu pancitopenie, malabsorbţie severă (prin suferinţa mucoasei intestinale), tulburări de creştere (hipogamaglobulinemie) manifestate în primele săptămâni de viaţă; prin tratament cu vitamină B_{12} în doze suprafiziologice pacienţii au putut fi menţinuţi în stare bună chiar după 10 ani (3 a). O *transcobalamină II anormală* a fost invocată într-un caz cu anemie megaloblastică severă cu creştere importantă a nivelului seric de TC II şi vitamină B_{12}, responsivă la tratamentul cu doze mari de vitamină B_{12} sau acid folic; anomalia genetică a TC II ar consta în incapacitatea ei de a elibera vitamina B_{12} către celule (27 a).

S-au mai descris cazuri (rare) de deficit congenital al unor enzime utilizând vitamina B_{12} drept coenzimă, dintre care mai importante sunt: *deficitul de malonil-CoA mutază* (cu acidoză metabolică severă, eliminări mari de AMM, absenţa megaloblastozei, uneori răspuns la doze mari de B_{12}) şi *deficitul de metiltransferază* (cu anemie megaloblastică, folat seric crescut, eliminări crescute de homocisteină, metionină scăzută).

Tulburări de utilizare a vitaminei B_{12} prin inhibarea unor enzime se pot presupune (între altele) din recăderile induse de infecţii în maladia Biermer, în alcoolism ş.a.

ANEMII MEGALOBLASTICE PRIN DEFICIT DE ACID FOLIC

Structura şi rolul fiziologic al acidului folic şi derivaţilor săi. Molecula de acid folic (fig. XXII.4), care este o vitamină din grupul B, se compune dintr-un inel pteridinic (cu o grupare 2-amino şi una 4-hidroxilică), un radical de acid paraaminobenzoic şi un grup peptidic format din 1—7 radicali glutamilici legaţi între ei în poziţia gamma). Acidul folic propriu-zis este acidul pteroilmonoglutemic, care pentru a deveni activ sub formă de coenzimă, trebuie redus de către dihidrofolat reductază în acid tetrahidrofolic (FH_4) (trecând prin forma intermediară semiredusă de acid dihidrofolic — FH_2). Pentru totalitatea derivaţilor de acid folic se utilizează termenul de folaţi. Majoritatea folaţilor din celulele organismului şi din alimente se găseşte sub formă de poliglutamaţi, care pentru a putea fi absorbiţi din intestin sau mobilizaţi din „depozitele celulare", trebuie „deconjugaţi" de către enzime specifice („conjugaze").

Rolul biologic al acidului folic (sub formă de coenzimă FH_4) este de a transfera unităţi de „carbon activ", pe care le fixează sau le cedează cu uşurinţă în cadrul unor reacţii ale metabolismului acizilor nucleici şi a

unor aminoacizi. În plus, prin reacțiile de interconversie (fig. XXII.5), coenzimele folice se pot transforma unele în altele, realizând adevărate circuite biochimice ale folatului, cu posibilitatea dirijării lui către reacțiile cele mai solicitate.

În sinteza nucleotidelor purinice, coenzimele folice intervin în reacțiile de încorporare a C_8 și C_2 în cursul formării nucleului purinic. În sinteza nucleotidelor pirimidinice, singura reacție dependentă de acidul folic este formarea timidilatului (prezent numai în ADN) prin metilarea uridilatului; în cursul acestei reacții are loc o reducere parțială a formei FH_4 în FH_2, care necesită ulterior o retransformare în FH_4 sub acțiunea dihidrofolat reductazei. În metabolismul aminoacizilor, coenzime folice intervin în interconversia glicocol-serină (reacție dependentă de piridoxal-fosfat), în catabolismul histidinei [transformarea acidului formiminoglutamic (FIGlu) în acid glutamic, reacție testată prin proba de încărcare cu histidină], precum și în sinteza metioninei, prin metilarea homocisteinei (prin intermediul unui alt sistem transportor, dependent de vitamina B_{12}), reacție care explică megaloblastoza din deficitul acestei vitamine (v. fig. XXII.5).

Circulația folaților în organism. Organismul uman fiind incapabil de a sintetiza folații, este dependent de aportul alimentar al acestora. Aflați sub formă de derivați formil și metil și în cea mai mare parte (90%) ca poliglutamați, în variate alimente de origine vegetală sau animală (cele mai bogate fiind legumele verzi, drojdia, ficatul, rinichii), folații alimentari pot fi distruși prin procedeele de preparare (fierbere) în proporție de 50—90%. Aportul alimentar zilnic cu o dietă mixtă a fost apreciat în jur de 600 μg folat total, necesitățile zilnice fiind evaluate la 50 μg/zi.

Absorbția folaților are loc la nivelul duodenului și al jejunului proximal (după transformarea poliglutamaților în monoglutamați de către conjugaza din celulele epiteliului intestinal) printr-un mecanism de transport activ (cu excepția, probabil, a formei metil-FH_4). În timpul absorbției are loc și reducerea în formă FH_4, precum și transformarea majorității folatului în forme metil (continuată ulterior în ficat) (8, 10).

Transportul plasmatic al folaților se face în stare liberă sau în legătură labilă, nespecifică, cu β-globuline (15), concentrația serică normală fiind de 6—21 μg/ml. Din plasmă folații trec în celule (14), unde sunt depozitați în cea mai mare parte sub formă de metil-FH_4 ca poliglutamați; stocul total de folați al organismului este evaluat la 5—10 mg, principalul organ de depozit fiind ficatul. O cantitate apreciabilă de metilfolat monoglutamic se elimină prin bilă, fiind apoi retroresorbit în intestin (circulație enterohepatică, ce poate fi tulburată, de exemplu în alcoolism) (34). Prin rinichi se elimină aproximativ 40 ng/zi; cea mai mare parte din cantitatea filtrată prin glomeruli este retroresorbită în tubii renali. Valorile normale ale folatului eritrocitar se situează între 160 și 640 μg/ml. Dozarea folaților în ser și lizate celulare (eritrocite) se face prin metode bacteriologice, care măsoară creșterea unor microorganisme dependente de folați (*Lactobacillus casei;* pentru dozări diferențiale, *Streptococcus fecalis* și *P. cerevisiae*) sau prin metode de diluție radioizotopică.

Clasificarea fiziopatologică a deficitului de acid folic. Se disting două categorii de deficit folic (tabelul 22.II): a) deficitul cantitativ (cantitate

TABELUL 22.II

Clasificarea fiziopatologică a deficitului de acid folic

Natura deficitului	Mecanism fiziopatologic	Situații clinice
1	2	3
A. *Deficit cantitativ* 1) Absolut	a) Aport alimentar insuficient	*Malnutriție* (de cauze economice, în diverse stări patologice ș.a.), prepararea inadecvată a alimentelor (fierbere prelungită)
	b) Prelucrare intestinală insuficientă — eliberare insuficientă din alimente — inhibarea „conjugazelor" (prin proliferare bacteriană, produși anormali de digestie, pH scăzut ș.a.)	Sindroame de *maldigestie* (prin tranzit intestinal accelerat, rezecție gastrică ș.a.) și *malabsorbție* (sprue tropicală, enteropatie glutenică ș.a.)
	c) Absorbție intestinală insuficientă — eliminarea unui segment intestinal — leziuni histologice ale peretelui intestinal — inhibarea transportului transcelular	Rezecții de jejun proximal, scurtcircuite intestinale Enteropatia glutenică (și alte boli cu malabsorbție) Consum de *alcool*, anticonvulsivante (anticoncepționale ș.a.) diverse boli intestinale inflamatorii
	— deficit genetic	Malabsorbția congenitală de folați
2) Relativ	a) Consum crescut — transfer maternofetal — proliferare celulară crescută	*Sarcină* *Eritropoieză hiperactivă* (anemii hemolitice, sângerări, eritropoieză ineficientă), boli mieloproliferative, cancere (extinse), dermatite exfoliative
	b) Eliminare crescută — intestinală (prin tulburarea circuitului enterohepatic) — renală (inhibarea retroresorbției tubulare) — prin secreția lactată	*Alcoolism*, hepatite Tratament cu antifolice Lactație prelungită
B. *Deficit de utilizare* (lipsă de folat activ)	a) Blocarea interconversiei coenzimelor folice — prin deficite enzimatice congenitale	Deficit de formiminotransferază ș.a.

TABELUL 22.II (Continuare)

1	2	3
	— prin analogi structurali ai AF (sau alte substanțe)	Tratament cu antifolice
	— în absența unor „mediatori"	Deficit de vitamină B_{12}
	b) Tulburări ale captării și depozitării în celule	
	— captare hepatică insuficientă	Ciroză hepatică
	— mobilizare crescută din depozite	Deficit de vitamină B_{12}
	c) Tulburări de utilizare mixte (cu blocarea — în grade variabile — a mai multor procese biochimice)	Alcoolism, infecții (mai ales urinare), uremie, sarcină, boli neoplazice și inflamatorii cronice (diverse alte stări patologice

scăzută de folați în organism) datorit fie intrării unor cantități insuficiente (deficit absolut, prin aport alimentar redus sau absorbție intestinală deficitară), fie disproporției între aport (normal) și necesități (crescute) (deficit relativ, prin consum crescut de folați), mai rar prin eliminări crescute; b) deficitul de utilizare (intrinsec, „calitativ"), în care folatul existent nu poate fi transformat în forme metabolic active din cauza lipsei unor „catalizatori" (de exemplu în deficitul de vitamină B_{12}), a blocării unor enzime (cum este FH_2 reductaza, în tratamentul cu antifolice), sau a unor deficite enzimatice congenitale.

În deficitul cantitativ are loc o epuizare treptată a stocurilor de folați cu tulburarea în cele din urmă a tuturor circuitelor metabolice care utilizează coenzime folice. Deoarece calitatea funcțională a enzimelor respective este normală, acidul folic administrat, chiar în doze mici, este utilizat prompt și duce la corectarea tulburărilor. Biochimic se constată scăderea tuturor formelor de folat atât în ser cât și în celule, precum și creșterea *clearance*-ului plasmatic al acidului folic (administrat i.v.).

În deficitul de utilizare stocurile de folați pot fi normale, dar cu scăderea formelor metabolic active. Circuitele metabolice ale folaților sunt afectate inegal, cel mai mult la nivelul reacției blocate; administrarea de acid folic nu corectează tulburările (decât în doze mari, dacă blocajul este incomplet). Folatul seric este de regulă normal, uneori chiar crescut; folatul eritrocitar este normal (cu excepția deficitului de vitamină B_{12}, când apare scăzut, datorită rolului acesteia în transferul folatului din plasmă în celule) (14, 66).

În practică aceste tipuri de deficite sunt rareori pure; cel mai des deficitul se realizează prin mai multe mecanisme, cu predominanța unuia dintre ele. Interpretarea manifestărilor clinice trebuie să țină seama de simptomatologia proprie bolii de bază și eventualelor complicații, de posibilitatea asocierii cu alte carențe, dar gradul deficitului, de modul de instalare (lentă sau bruscă).

Diagnosticul deficitului folic se face în mod obișnuit prin demonstrarea scăderii folatului seric și (mai ales) a folatului eritrocitar, prin testul de încărcare cu histidină (FIGlu), eventual prin proba terapeutică

cu doze mici de acid folic; în cazuri speciale se mai poate cerceta absorbția intestinală (cu acid folic marcat), *clearance*-ul plasmatic, se pot efectua teste enzimatice specifice ș.a.

Forme etiopatogenice și clinice ale deficitului folic. *Anemia megaloblastică prin deficit nutrițional de folați* este frecvent întâlnită în țările slab dezvoltate economic; la aportul alimentar sărac în folați se adaugă deseori o absorbție deficitară (prin tulburări gastrointestinale), consum crescut (prin sarcini, hemoliză în cadrul unor eventuale hemoglobinopatii asociate), sângerări (prin parazitoze intestinale), tulburări de utilizare (prin infecții, alcoolism), cu asocierea frecventă a altor carențe (de fier, proteine), încât boala se prezintă adesea cu tabloul polimorf al unor „anemii mixte".

În zona noastră geografică, deși duce mai rar la anemie megaloblastică francă, deficitul folic nutrițional se întâlnește frecvent în caz de restricții alimentare prelungite prin inapetență, boli cronice, vârstă avansată, psihopatii, condiții economice precare; fierberea prelungită a alimentelor poate reduce conținutul lor în folați.

Datorită stocurilor relativ mici de folați în raport cu necesitățile zilnice, în condițiile reducerii extreme a folaților alimentari [sub 5 μg/zi; experimental (30)], semnele deficitului folic apar curând (începând cu scăderea folatului seric, apoi hipersegmentarea granulocitelor, pozitivarea testului FIGlu, scăderea folatului eritrocitar), ajungându-se după 4 luni la macrocitoză și transformare megaloblastică a măduvei, urmată de anemie și tulburări nervoase.

Anemia megaloblastică la copiii mici (2—14 luni), cu excepția unor boli genetice, are la bază nevoile crescute de folați (50 μg/zi, de circa 4 ori mai mult decât la adult) în combinație cu reducerea aportului alimentar prin alimentație artificială cu lapte fiert sau lapte de capră (foarte sărac în folați); asocierea frecventă cu scorbutul sugerează un rol posibil al vitaminei C în stabilizarea folatului alimentar.

Absorbția deficitară de folați poate exista în variate afecțiuni intestinale cu sindroame de malabsorbție; deficitul folic care apare (de regulă în cadrul unei pluricarențe) poate duce la instalarea unei anemii, megaloblastice.

Sprue tropical, boală cu etiologie neclară, posibil infecțioasă (40), debutează cu diaree, inapetență, astenie, urmate de o fază cu semne de pluricarență consecutivă malabsorbției prelungite a diferiți constituenți alimentari și, ulterior, de instalarea unei anemii megaloblastice. Absorbția deficitară a folatului alimentar pare să țină în mare măsură de inhibarea conjugazelor intestinale datorită proliferării bacteriene [probabil prin intermediul unor produși de degradare a sărurilor biliare (8)]. Deficitul folic are un rol important în leziunile mucoasei intestinale, dovadă rezultatele uneori spectaculare obținute prin administrarea de acid folic; alte cazuri pot răspunde mai bine la antibiotice.

În *enteropatia glutenică (sprue nostras,* boala celiacă) datorată sensibilizării la gliadină, se produce o atrofie pronunțată a vilozităților intestinale cu malabsorbție, interesând mai ales lipidele, calciul, fierul și diferite vitamine; deficitul folic poate fi evidențiat la 90% din bolnavi, cel de vitamină B_{12} în aproape 40% din cazuri. Tratamentul cu acid folic

(eventual urmat de vitamina B_{12} și fier) corectează anemia, dar nu ameliorează leziunile mucoasei intestinale.

Absorbție deficitară de folați poate surveni și în *alte afecțiuni intestinale* (cu interesarea jejunului), ca rezecții intestinale, infiltrații limfomatoase sau inflamatorii cronice, amiloidoză, boala Whipple, precum și în rezecțiile gastrice întinse.

În *malabsorbția congenitală de acid folic* (42), rară, defectul genetic interferează cu mecanismul de transport activ prin celula intestinală (și trecerea din plasmă în LCR); boala se caracterizează prin anemie megaloblastică cu folatemie extrem de scăzută și leziuni neurologice; epiteliul intestinal este histologic normal. Anemia se corectează cu acid folic administrat parenteral (sau oral, în doze foarte mari).

ANEMII MEGALOBLASTICE PRIN CONSUM CRESCUT DE FOLAȚI

De importanță deosebită este *anemia macromegaloblastică de sarcină* având în vedere frecvența deficitului folic în sarcină, cu efecte uneori grave asupra organismului matern și eventuale consecințe privind dezvoltarea sarcinii.

În patogeneza ei complexă intră mai multe elemente: stocul de folați scăzut în prealabil [prin condiții economice precare, sarcini anterioare recente, multiple (33), eventuale sângerări sau boli hemolitice coexistente], transferul către făt al folatului matern (mobilizarea din depozite și dirijarea lui preferențială pe anumite circuite metabolice, tinzând să asigure necesitățile fetale chiar în condiții de carență accentuată în organismul matern), tulburări de utilizare (prin infecții, mai ales pielorenale, cu rol în declanșarea anemiei megaloblastice).

În funcție de data instalării și gradul deficitului pot apărea tulburări în formarea organismului și anexelor fetale, manifestate prin avort, malformații fetale sau placentare (de 2—4 ori mai frecvente decât în populația generală) (33).

Boala se manifestă de regulă în intervalul de 4 săptămâni înainte și după naștere (24), simptomele cel mai des întâlnite fiind anorexia, stomatita, febra, subicterul. Splina și ficatul sunt ușor mărite. Nu rareori o infecție pielorenală sau toxemia gravidică precedă instalarea unei anemii severe. Hematologic, macrocitoza și anizocitoza eritrocitară sunt mai puțin pronunțate decât în anemia Biermer, în caz de sideropenie asociată putând predomina hipocromia. În măduvă, transformarea megaloblastică a seriei roșii poate fi mai puțin accentuată (uneori predomină eritroblaștii „feriprivi"), iar în caz de infecție asociată apare hiperplazia seriei granulocitare cu modificări megaloblastice accentuate și leucocitoză cu hipersegmentare nucleară în sângele periferic.

Administrarea de acid folic a ameliorat mult prognosticul, altădată grav, al acestei boli. Administrarea profilactică a acidului folic în sarcină reduce mult incidența.

Un consum crescut de folați există în toate stările de *hiperactivitate a măduvei hematopoietice*, transformarea megaloblastică fiind semnalată în variate tipuri de *anemii hemolitice* (sferocitoză ereditară, talasemie, hemoglobinurie paroxistică nocturnă ș.a.).

Aceasta poate apărea cu toate gradele de intensitate, de la o morfologie megaloblastică minimă până la transformare megaloblastică totală

cu oprire completă de diviziune, manifestată prin scădere rapidă a cifrei de hemoglobină și a reticulocitelor, reducerea icterului; situația trebuie diferențiată (pe baza tabloului medular) de „crizele aplastice" din aceste boli. În cazurile necunoscute dinainte trebuie făcut diagnosticul diferențial cu anemia Biermer. Tratamentul se face cu acid folic și concomitent, după caz, sânge, corticosteroizi, antibiotice. Profilaxia cu acid folic ar trebui făcută sistematic în toate anemiile hemolitice.

Și în *alte anemii* cu eritropoieză crescută, eficientă (de exemplu după sângerări) sau ineficientă (a. feriprive, a. refractare de diferite tipuri ș.a.), există un consum crescut de folați; deoarece nu totdeauna gradul modificărilor megaloblastice concordă cu nivelul folatemiei, se presupune intervenția unor tulburări de utilizare sau mecanisme independente de deficitul folic.

În *dermatitele cronice* exfoliative se pot pierde prin descuamare cantități mari de folat (5—20 μg/zi), constatându-se frecvent semne de deficit folic (41), ceea ce justifică administrarea de acid folic, mai ales în cazurile tratate cu methotrexat.

În *bolile mieloproliferative cronice* ca și în *leucemiile acute* poate exista un consum important de folați care să ducă la depleția stocurilor, dar modificările megaloblastice cel mai frecvent întâlnite la acești bolnavi sunt cele datorate tratamentelor cu citostatice.

În *cancere* deficitul folic pare să fie corelat cu extensia procesului malign (folatemia fiind scăzută în 85% din cazurile cu metastază). În metastazele hepatice folatul seric poate fi uneori crescut, posibil prin eliberarea folatului din hepatocitele distruse (44); modificările megaloblastice par să survină mai frecvent în caz de metastaze osoase (69). Patogeneza deficitului folic din cancere este complexă, pe lângă consumul crescut putând interveni factori ce țin de restricția alimentară, tulburări digestive, insuficiență hepatică, tulburări de utilizare (prin produși de degradare celulară, infecții).

ANEMII MEGALOBLASTICE CU PIERDERI CRESCUTE ȘI TULBURĂRI DE DEPOZITARE A FOLAȚILOR

În *cirozele hepatice* (39) se întâlnește frecvent o anemie cu patogenie intricată (hemodiluție, sângerări, absorbție și utilizare deficitară de factori hematopoietici ș.a.), prezentând deseori macrocitoză fără megaloblastoză. Frecvența anemiei megaloblastice în ciroza alcoolică este apreciată diferit, după criteriile utilizate, fiind peste 20% dacă se iau în considerare și „semnele precoce" (ca hipersegmentarea leucocitelor și megaloblaștii „intermediari"). Deși există o scădere importantă a încorporării hepatice de vitamină B_{12} (necorectată cu F.I.), anemiile macromegalocitare din ciroze se datorează aproape totdeauna deficitului folic, care ține în parte de aportul alimentar scăzut, dar și de tulburări metabolice incluzând scăderea capacității de depozitare în ficat cu eliminări urinare crescute și tulburarea circuitului enterohepatic al folatului (la care contribuie și ingestia de alcool), cu pierderi intestinale importante. Folatul seric este scăzut, testul FIGlu pozitiv.

În *tratamentul cu antifolice* există, de asemenea, o mobilizare a folatului din depozite, cu eliminări urinare crescute, datorită și unei retroresorbții tubulare scăzute.

Medicamentele antifolice, cum sunt aminopterina, ametopterina, methotrexatul (analogi structurali inactivi ai acidului folic, utilizați în tratamentul leucemiilor acute și a altor boli proliferative) acționează prin blocare (competitivă) a dihidrofolat reductazei, ducând la scăderea tuturor formelor FH_4 (coenzimatic active) și consecutiv — la transformarea megaloblastică cu oprirea diviziunilor celulare, intensitatea efectului depinzând și de rata de multiplicare celulară.

În dozele terapeutice uzuale, se poate ajunge la transformare megaloblastică urmată de hipoplazia medulară de diferite grade, cu leucotrombocitopenie (uneori importantă); totodată pot apărea semne de suferință a altor sisteme celulare cu rată mare de diviziune: epiteliul digestiv (semne de iritație, ulcerații, diarei), tegumente (alopecie ș.a.), celule embrionare și placentare (risc de avort, malformații fetoplacentare).

Efectul toxic al antifolicelor poate fi suprimat numai prin administrare de derivați FH_4 (leucovorin, citravorum factor sau acid folinic), nu și de acid folic neredus.

Diferite *alte medicamente*, cum sunt unele anticonvulsivante (fenobarbital, difenilhidantoină, hidantoină) (64), antimalarice (pirimetamină), tuberculostatice (cicloserina, izoniazida), unele anticoncepționale (62) pot duce, după utilizare îndelungată, la semne de deficit folic, în general ușoare, prin mecanisme patogenetice insuficient elucidate, în care intră de regulă și tulburări de utilizare prin inhibarea enzimelor metabolismului folic (uneori și inhibarea absorbției intestinale).

Alcoolul are interferențe multiple cu metabolismul folaților, principalele mecanisme fiind reducerea absorbției intestinale prin inhibarea „conjugazelor", tulburarea circuitului enterohepatic al folaților (34), inhibarea unor enzime care intervin în utilizarea și stocarea celulară a lor.

Experimental (20), administrarea alcoolului concomitent cu o alimentație săracă în folați duce rapid la scăderea folatului seric și la megaloblastoză, iar ulterior la sideroblastoză (cu semnele biochimice ale deficitului de piridoxină).

Rolul *infecțiilor*, ca și al altor stări „toxemice" (insuficiență renală, toxicoză gravidică) sau inflamatorii (reumatism) în afectarea metabolismului folaților reiese din precipitarea (uneori brutală) a instalării megaloblastozei într-un deficit folic latent, din scăderea mai pronunțată a folatului seric față de cel eritrocitar și din caracterul parțial refractar la tratamentul cu acid folic.

Din deficitele enzimatice congenitale (rare) interesând metabolismul folaților (vezi fig. XXII.5) (4) s-au descris până în prezent; *deficitul de formiminotransferază* cu leziuni nervoase grave (prin afectarea circuitului sintezei purinelor), folat seric mult crescut, megaloblastoză inconstantă (circuitul sintezei ADN nefiind afectat direct) și test FIGlu intens pozitiv; *deficitul de ciclohidrolază* cu leziuni nervoase, dar cu test FIGlu negativ; *deficitul de N^5-metil transferază* și de *FH_2-reductază* (63).

În această categorie de boli megaloblastoza se datorează blocării unor reacții de biosinteză a ADN prin tratament cu citostatice sau prin deficitul enzimelor înseși (congenital sau apărut în cursul unor procese patologice).

Din deficitele enzimatice congenitale trebuie menționată *aciduria orotică* ereditară, transmisă după tipul autosomal-recesiv și caracterizată prin eliminare în cantitate mare de acid orotic, dezvoltare fizică și mentală deficitare și anemie megaloblastică. Este datorată blocării ultimelor două trepte în sinteza acidului uridilic. Tulburările pot fi corectate prin administrare de acid uridilic sau timidilic.

În *sindromul Lesch-Nyhan,* în care metabolismul guaninei este tulburat printr-un defect de hipoxantin-guanin-fosforibozil transferază (legat de cromosomul X), există hiperuricemie, tulburări neurologice și mentale și uneori anemie megaloblastică, corectate prin administrare de adenină.

S-au mai descris câteva cazuri de *anemie megaloblastică cu răspuns la tiamină,* incidență familială și anomalii asociate [proteinurie, surditate neurogenă, diabet zaharat (54, 67)], iar recent — și deficit de α-cetoglutarat dehidrogenază (1 a).

Unele *medicamente* pot produce o anemie megaloblastică prin inhibarea unor enzime implicate în sinteza ADN; printre acestea 5-fluorouracilul inhibă direct timidilat sintetaza, inhibiție care este mărită prin adaosul la tratamentul cu 5-fluorouracil de leucovorin. Alți inhibitori metabolici sunt methotrexatul, 6-mercaptopurina, azatioprina, hidroxiureea, citosin-arabinosid.

În *anemiile refractare,* ca și în *mieloza eritremică* (di Guglielmo) există adesea o morfologie megaloblastică ce ține probabil de defecte enzimatice (necunoscute) cu implicații în sinteza ADN (69).

Prezența sideroblastozei în multe din anemiile refractare sugerează o afectare concomitentă a metabolismului piridoxinei, al cărei deficit se poate însoți în rare cazuri de megaloblastoză (care poate răspunde uneori la tratament cu piridoxină).

PRINCIPII DE DIAGNOSTIC ȘI TRATAMENT ÎN ANEMIILE MEGALOBLASTICE

Schema de investigații a unei anemii megaloblastice poate varia mult în funcție de situația clinică și hematologică, de contextul patogenetic în care apare și eventual de caracterul profilactic al cercetării etc.

În majoritatea cazurilor, investigarea parcurge următoarea secvență: constatarea anemiei, precizarea elementelor megaloblastozei, diagnosticul deficitului de vitamină B_{12} sau de acid folic (sau excluderea lor), stabilirea mecanismului fiziopatologic prin care se realizează deficitul, determinarea entității sau contextului nosologic în care apare.

Din punctul de vedere al diagnosticului precoce și al profilaxiei este util de remarcat că secvența în timp a tulburărilor este exact inversă și s-ar putea

chiar distinge în instalarea acestor avitaminoze mai întâi o fază biochimică (cu scăderea lor în mediile organismului), urmată de una hematologică (apariția megaloblastozei) și de faza clinică (instalarea anemiei și a altor semne).

Într-un număr de cazuri investigarea bolnavului poate porni de la semne ținând de neuropatie, tulburări digestive, icter sau de la constatarea unei stări fiziopatologice cu potențial de generare a acestor deficite vitaminice (sarcină, anemii hemolitice, botriocefaloză etc.), ceea ce schimbă corespunzător schema de investigații.

Diagnosticul megaloblastozei, în general ușor în formele complet constituite, se bazează pe modificările morfologiei celulare în sânge și măduva osoasă descrise anterior, în prezența semnelor de eritropoieză ineficientă.

Importante pentru diagnosticul precoce pot fi modificările megaloblastice „minore" (12, 33), care constau în prezența megaloblaștilor „intermediari", a celulelor granulocitare gigante în proporție de peste 5% (până la 20%) din celulele medulare, precum și a granulocitelor hipersegmentate în sânge. Astfel de modificări pot apărea însă și în absența unui deficit propriu-zis de vitamină B_{12} sau acid folic, de exemplu în anemia feriprivă, sarcină, infecții etc.

DIAGNOSTICUL ETIOPATOGENETIC

Are ca obiectiv evidențierea deficitului de vitamină B_{12} sau acid folic și a cauzelor sale.

Interpretarea datelor clinice și hematologice permite o orientare în acest sens, care poate ajunge aproape de certitudine în unele cazuri.

Astfel, o anamneză care relevează un deficit alimentar cronic (asociat adesea cu alcoolismul), sarcini multiple, boli intestinale cu afectarea predominantă a jejunului și în general tulburările gastrointestinale cu malabsorbție sugerează mai degrabă un deficit de acid folic, în timp ce starea nutrițională bună, rezecțiile gastrice întinse sau cele de ileon sau fistulele gastro- ori jejunocolice sunt sugestive pentru deficitul de vitamină B_{12}, în care, alături de anemie, există adesea tulburări neurologice (cu altă simptomatologie decât aceea a unei eventuale polinevrite alcoolice în deficitul folic nutrițional). Examenul clinic aduce, la rândul său, completări esențiale pentru precizarea etiopatogenezei.

Examenul hematologic constată deseori în anemia Addison-Biermer un aspect de anemie megaloblastică „clasică", în timp ce în deficitul folic tabloul sanguin și medular este adesea incomplet sau amestecat (cu elemente de macrocitoză, sideropenie, infecție). Spre deosebire de modificările megaloblastice întâlnite în anemiile refractare, în mieloza eritremică există în general o predominanță a modificărilor displazice asupra celor megaloblastice, iar reacția PAS în eritroblaști este de regulă pozitivă.

Mijlocul cel mai sigur de diferențiere între deficitul de vitamină B_{12} și acela de acid folic este *determinarea nivelului* lor *în ser și eritrocite* prin metode bacteriologice (65, 3, 35, 18, 36) sau de diluție radioizotopică (43) (primele fiind mai precise).

Dat fiind că cea mai mare parte a vitaminei B_{12} din ser este legată de T.C. II și se află în echilibru cu rezervele generale ale organismului, dozarea nivelului ei seric este suficientă pentru evidențierea unui eventual deficit.

Spre deosebire de aceasta, nivelul folatului seric este mai labil, influențat rapid de aportul alimentar, cu scăderi nespecifice în infecții, neoplazii, în anemia feriprivă etc.; de aceea, folatul eritrocitar (încorporat în faza de eritroblast) reflectă mai fidel situația reală a depozitelor celulare în organism.

Deficitul uneia din vitamine poate duce la scăderea nivelului sanguin al celeilalte, dar în măsură mai mică decât apare în deficitul vitaminei corespunzătoare. Astfel, în deficitul de vitamină B_{12} nivelul seric al acesteia scade adesea mult sub zona critică (150—100 pg/ml), chiar până la 10 pg/ml sau mai puțin; totodată are loc o scădere moderată a folatului eritrocitar, de regulă însă cu creșterea folatului seric (explicată prin rolul vitaminei B_{12} în transportul metilfolatului prin membrana celulară). În deficitul folic are loc o scădere importantă a folatului seric (sub 3 ng/ml) și a celui eritrocitar (sub 100 ng uneori chiar sub 50 ng/ml), cu eventuală scădere a vitaminei B_{12} în ser.

Dintre *testele metabolice* se utilizează pentru evidențierea deficitului de vitamină B_{12} eliminarea urinară de acid metilmalonic (AMM) (25) (azot sub 9 mg/24 ore), care crește la câteva zeci de mg (chiar 300 mg) pe zi, în special în formele cu neuropatie; eliminările sunt și mai mari după administrarea orală de valină (10 g); testul este pozitiv și în tulburări de alte cauze ale metabolismului acidului propionic. Eliminarea urinară de acid formiminoglutamic (FIGlu) (38), după încărcare cu histidină (15 g, oral) (azot 1—17 mg FIGlu în primele 8 ore) este crescută în deficitul folic (între 200 și 2 000 mg); creșteri în general mai puțin importante apar la circa 50% din cazurile de deficit de vitamină B_{12}, în sarcină, insuficiență hepatică ș.a. Recent au fost propuse, ca echivalente mult mai precise ale acestor teste, dozarea în ser a AMM, respectiv a homocisteinei (5 a). Valorile lor normale sunt 70—270 nM pentru AMM și 5—16 nM pentru homocisteină și cresc în deficitul de vitamină B_{12} la în medie 3 500 nM pentru AMM și respectiv 70 nM.

Proba terapeutică (70) cu doze „fiziologice" de vitamină B_{12} (1—5 μg/24 ore parenteral) sau acid folic (50—100 μg/24 ore, oral), cu urmărirea creșterii cifrei de reticulocite și hemoglobină, presupune existența unei anemii semnificative; infecțiile și alți factori pot invalida proba.

O metodă sensibilă de diferențiere între cele două deficite vitaminice este testul de *supresie a încorporării dezoxiuridinei* (dU) (32).

În ambele deficite vitaminice transformarea uridilatului (prin metilare) în timidilat este deficitară, datorită scăderii coenzimei folice N^5—N^{10}-metilen-FH_4 (v. fig. XXII.5). În timp ce adăugarea de dU, la o cultură de celule medulare normale, duce la încorporarea acesteia în ADN în așa măsură încât dezoxitimidinmonofosfatul (dTMP marcat cu ^3H) adăugat ulterior nu se absoarbe decât în proporție redusă (sub 10%), în deficitul de vitamină B_{12} sau acid folic dTMP este încorporat în proporție mare. Adaosul de folat (sub formă de formil-FH_4) (14) normalizează testul atât în deficitul de folați cât și în cel de vitamină B_{12}, în timp ce adăugarea vitaminei B_{12} nu corectează valorile decât în deficitul acestei vitamine. Prin adaosul acestor vitamine în doze minime eficiente se pot obține însă corecții selective.

În precizarea mecanismului fiziopatologic al deficitului vitaminic datele anamnestice și clinice pot revela existența unor condiții patologice generatoare de malnutriție, malabsorbție, consum crescut etc. prezentate anterior. Deficitele de utilizare prin defecte genetice pot fi sugerate de existența unor anomalii somatice sau biochimice asociate. La nevoie

se pot efectua investigații de laborator suplimentare, din care cea mai importantă în practică este cercetarea absorbției intestinale a vitaminei B_{12} prin testul Schilling (57).

În varianta cea mai utilizată, acest test măsoară eliminarea urinară în primele 24 de ore a vitaminei B_{12} marcată radioactiv (^{57}Co, 0,5 μCi) administrată oral, urmată după 2 ore de administrarea i.m. a 1 mg de vitamină B_{12} „rece" (cu rolul de a împiedica fixarea vitaminei radioactive prin blocarea receptorilor celulari). În aceste condiții, eliminarea normală de vitamină B_{12} se situează între 8 și 40% din doza administrată, valori mult scăzute (sub 2%) găsindu-se în anemia Addison-Biermer, în care testul se corectează prin administrare concomitentă de factor intrinsec (spre deosebire de tulburările de absorbție prin alte mecanisme); factori de eroare sunt insuficiența renală și cardiacă, infecțiile ș.a.

TRATAMENTUL ANEMIILOR MEGALOBLASTICE

Tratamentul trebuie să aibă ca fundament o încadrare etiopatogenetică și fiziopatologică corectă, cu evaluarea tuturor elementelor care intră în complexul patologic al cazului dat, inclusiv observarea atentă a particularităților răspunsului la tratament.

Un tratament etiologic este uneori posibil, de exemplu în deficitul de vitamină B_{12} prin infestare cu botriocefal, prin proliferare bacteriană datorită unor afecțiuni intestinale corectabile chirurgical, în megaloblastozele din tratamentul cu citostatice etc.

În cele mai multe cazuri tratamentul este etiopatogenetic, adresându-se atât cauzei primare a bolii (în măsura în care poate fi cel puțin atenuată), cât și direct deficitului vitaminic, prin tratament substitutiv; trebuie să se țină seama și de condițiile fiziopatologice în care se realizează deficitul (inclusiv prezența complicațiilor sau a unor boli asociate).

În tratamentul substitutiv cu vitamină B_{12} sau acid folic trebuie respectate anumite reguli generale bazate pe evaluarea corectă a cauzei, precum și pe caracteristicile farmacologice ale preparatelor utilizate.

În ceea ce privește calea de administrare, cea orală este eficientă nu numai în deficitul nutrițional de folați, dar și în tulburările de absorbție ale acestora, unde (cu excepția malabsorbției congenitale de acid folic) absorbția formelor monoglutamice decurge normal. În anemia Biermer, în care administrarea orală (cu excepția dozelor mari) este ineficientă, se utilizează calea parenterală (mai avantajoasă decât asocierea vitaminei B_{12} cu F.I. oral). Calea intrarahidiană (cu vitamină B_{12} în doze mari) a fost utilizată cu succes în unele cazuri de neuropatie biermeriană gravă.

Forma medicamentoasă are importanță, de exemplu în deficitul folic prin blocarea FH_2-reductazei (în tratamentul cu methotrexat), unde este necesară administrarea formei reduse (leucovorin), acidul folic medicamentos obișnuit (neredus) neputând fi metabolizat.

Cantitatea administrată depinde de capacitatea de absorbție și de utilizarea sau stocarea vitaminei respective în cazul dat. Astfel, administrarea în doze orale foarte mari poate depăși tulburarea de absorbție a vitaminei B_{12} în anemia Biermer, precum acidul folic în doze mari — pe aceea din malabsorbția congenitală a acestuia; chiar blocajele metabolice de utilizare (ca de exemplu în deficite folice prin enzimopatii congenitale) pot fi depășite în măsura în care nu sunt totale. Deseori prezența unei infecții poate conferi deficitului un caracter parțial refractar, în acest caz fiind recomandabilă creșterea dozelor și bineînțeles tratarea infecției.

Ritmul şi durata administrării urmăreşte corectarea tulburărilor şi refacerea rapidă a stocurilor vitaminei deficitare, ţinând seama de capacitatea de fixare şi retenţie a vitaminei administrate (care poate prezenta variaţii individuale relativ mari).

În situaţiile cu persistenţa indefinită a tulburării de bază (ca în anemia Biermer) se instituie un tratament de întreţinere, cu eventuală ajustare a dozelor şi ritmului de administrare în cazurile cu tendinţă la recăderi precoce (evidenţiate eventual prin determinări ale vitaminemiei).

În situaţiile cu potenţial important de generare a deficitului folic (de exemplu în sarcină, anemii hemolitice ş.a.) se recomandă tratament profilactic, aplicat sistematic sau cel puţin în faza precoce a deficitului.

Tratamentul cu vitamine al unei anemii fără diagnostic precizat sau abuzul de tratamente cu polivitamine şi vitamină B_{12} în variate situaţii cu disconfort fizic sau nervos sunt greşeli care pot întârzia mult stabilirea diagnosticului unei anemii Addison-Biermer şi favoriza astfel instalarea unei neuropatii severe.

BIBLIOGRAFIE

1. DE AIZPURUA H., COSGROVE L. şi colab.: New Engl. J. Med. 1983; 11: 309.
1a. ABBOUD M. R., ALEXANDER D., NAJJAR S. S.: J. Pediat. (St. Louis) 1985; 107/4: 537—541.
2. ALLEN A. J.: J. Clin. Invest. 1978; 16: 1628.
2a. ALLEN H. R.: În Wyngaarden (ed.): Cecil Textbook of Medicine. W. B. Saunders Co., 1993, 846.
3. ANDERSON B. B.: J. Clin. Pathol. 1964; 17: 4.
3a. ARRABAL M. C., VILLEGAS A., MARISCAL E. şi colab.: Acta Haematol. 1988; 80/3: 162—166.
4. ARAKAWA T.: Am. J. Med. 1970; 48: 595.
5. BECK W. S.: În WILLIAMS W. J., BEUTLER E., ERSLEV A. J., LICHTMAN M. E. (eds.): Hematology. Edit. McGraw Hill, New York, 1983.
5a. BECK W. S.: Annu. Rev. Med. 1991; 42: 311—322.
6. BAKER H. şi colab.: JAMA 1964; 187: 119.
7. BEGEMANN H., RASTETTER J.: În HEILMEYER L. (ed.): Blut und Blutkrankheiten. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1970.
8. BERNSTEIN L. H.: Am. J. Med. 1970; 48: 570.
9. BODDY K. şi colab.: Lancet 1968; 2: 710.
9a. BOSS G. R.: J. Clin. Invest 1985; 76/1: 213—218.
10. BUTTERWORTH C., KRUMDIEK E.: Br. J. Haematol. 1979; 31: 111.
11. CARMEL R., JOHNSON C. S.: New Engl. J. Med. 1978; 298: 647.
12. CHANARIN I.: The megaloblastic anemias, Edit. Davis, Philadelphia, 1969.
13. CHANARIN I., JAMES D.: Lancet 1974; 1: 1078.
14. CHANARIN I., DEACON R. şi colab.: Blood 1985; 66: 479.
15. CHANARIN I., DEACON R. şi colab.: Lancet 1980; 2: 505.
16. COSTA M. şi colab.: J. Lab. Clin. Med. 1978; 91: 901.
17. DELLIPI A. W. şi colab.: Am. J. Dig. Dis. 1968; 13: 718.
18. DAVIS R. E., NICOL D. J., KELLY A.: J. Clin. Pathol. 1970; 23: 47.
19. DONALDSON R. M.: Gastroenterology 1962; 43: 271.
19a. DOYLE J. J., LANGEVIN A. M., ZIPURSKY A.: Pediat. Hematol. Oncol. 1989; 6/2: 161—172.
20. EICHNER E. R. şi colab.: Am. J. Med. 1971; 50: 218.
21. FINLAYSON N. D. C. şi colab.: Am. J. Fig. Dis. 1972; 17: 631.
22. FRENKEL E. P.: J. Clin. Invest. 1971; 50: 33, a.
23. GAMS R. A. şi colab.: Blood 1976; 47: 443.
24. GILES C.: J. Clin. Pathol. 1966; 19: 1.
25. GIORGIO A. J., PLAUT G. W. E.: J. Lab. Clin. Med. 1965; 66: 667.

26. GRÄSBECK R.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1967; 19: 7.
26a. HAKAMI N. şi colab.: J. Pediat. 1972; 81: 1106.
26b. HALL C. A. şi colab.: Blood 1979; 53: 251.
27. HAURANI F. I.: Science 1973; 182: 78.
27a. HAURANI F. I. şi colab.: Clin. Invest. 1979; 64: 1253.
28. HELMUTH C. H.: XII-th Congr. Intern. Soc. Hematol., Therapy Session Papers, New York, 1970, 318.
29. HERBERT V.: Lancet 1974; 2: 834.
30. HERBERT V.: Arch. Intern. Med. 1962; 110: 649.
31. HERBERT V., CASTLE W. B.: New Engl. J. Med. 1962; 110: 649.
32. HERBERT V. şi colab.: Br. J. Haematol. 1973; 24: 713.
33. HIBBARD B. M.: Acta Obst. Gynec. Scand. 1967; 46 (suppl. 7).
34. HILLMAN R. S. şi colab.: J. Clin. Invest. 1979; 64: 83.
35. HOFFBRAND A. V. şi colab.: J. Clin. Pathol. 1966; 19: 17.
36. HOSSU T.: Contribuţii la studiul deficitului folic în sarcină. Teză de doctorat, I.M.F. Bucureşti, 1974.
37. McINTYRE O. R. şi colab.: New Engl. J. Med. 1965; 272: 981.
38. JOHNSTONE J. M. şi colab.: Clin. Chim. Acta 1960; 12: 440.
39. KIMBER C. şi colab.: Am. J. Med. 1965; 38: 767.
40. KLIPSTEIN F. A. şi colab.: Blood 1975; 45: 577.
41. KNOWLES J. P. şi colab.: Lancet 1963; 1: 1138.
42. LANZKOWSKI P. H.: Am. J. Med. 1970; 48: 580.
43. LAU K. S. şi colab.: Blood 1967; 29: 139.
43a. LORAS-DUCLOS B., SOUILLET G. şi colab.: Arch. Fr. Pédiat. 1988; 45/3: 197—199.
44. MAGNUS E. M.: Cancer Res. 1967; 27, part I: 3.
45. MAHONY M. J., ROSENBERG L. E.: Am. J. Med. 1970; 40: 584.
46. MATHÉ G., KENIS Y.: La chimiothérapie des cancers. Expans. Sci. Fr., Paris, 1975, 50.
47. MILLER D. R. şi colab.: New Engl. J. Med. 1966; 275: 978.
48. NIXON P. F., BERTINO J. R.: J. Clin. Invest. 1972; 51: 1431.
49. NYBERG W. şi colab.: Am. J. Clin. Nutr. 1961; 9: 306.
50. NYSTRÖM B., NYSTRÖM C.: Acta Obst. Gynaec. Scand. 1967; 46 (suppl. 7).
51. PERRY J. şi colab.: Br. J. Haematol. 1976; 32: 243.
52. PERRY J., CHANARIN I. şi colab.: J. Clin. Invest. 1983; 71: 1183.
53. RAPAZZO M. E., HALL C. A.: J. Clin. Invest. 1972; 51: 1915.
54. ROGER L. E. şi colab.: J. Pediat. 1969; 74: 494.
55. ROHR C.: Das menschliche Knochenmark, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1960.
56. SAMLOFF I. M. şi colab.: Gastroenterology 1968; 55: 575.
57. SCHILLING R. F. şi colab.: J. Lab. Clin. Med. 1955; 45: 926.
58. SCHUH S., ROSENBLATT D. şi colab.: New Engl. J. Med. 1984; 310: 211.
59. SCOTT J. M. şi colab.: J. Clin Invest. 1974; 53: 228.
60. SILBER R., MOLDOW C. H.: Am. J. Med. 1970; 48: 5.
61. SMITH L. H.: Am. J. Med. 1965; 38: 1.
62. STREIFF R. R.: JAMA 1970; 214: 105.
63. TAURO J. P. şi colab.: New Engl. J. Med. 1976; 294: 466.
64. TEASDALE P. R., PEARCE J. J.: Clin. Pathol. 1972; 25: 721.
65. TIFFIN A. I., WILLIAMSON G. M.: J. Clin. Pathol. 1958; 11: 223.
66. TISMAN G., HERBERT V.: Blood 1973; 41: 465.
67. VIANA M. B., CARVALHO R. I.: J. Pediat. 1978; 93: 235.
68. WATERS A. H., MOLLIN D. L.: Br. J. Haematol. 1963; 9: 319.
69. WILLIAMS J. W., BEUTLER E., ERSLEV A. J., LICHTMAN M. E.: Hematology, Edit. McGraw Hill, New York, 1983.
70. WINTROBE M. M. şi colab.: Clinical Hematology, Edit. Lea-Febiger, Philadelphia, 1981.
71. WOLSER A., EIGEN, ANN H., GUT A.: Schweiz. Med. Wschr. 1989; 119/30: 1053—1056.

XXIII

ANEMIILE APLASTICE

G. GRIGORIU, ANCA POPP

Definiție. Anemia aplastică este o afecțiune a sistemului hematopoietic, caracterizată prin pancitopenie și măduvă osoasă hipo- sau aplazică. În esență, depopularea măduvei osoase de celule stem hematopoietice duce la dispariția celulelor parenchimului „mieloid" și înlocuirea acestora cu celule adipoase. Termenul de anemie aplastică este sinonim cu cel de aplazie medulară, în circulație la noi, și cu cel de panmielopatie din literatura germană. Mai corectă ar fi denumirea de pancitopenie aplastică, dar termenul de anemie aplastică este unanim acceptat.

Conceptul de aplazie medulară a fost introdus de Ehrlich în 1886, când a publicat cazul unei fete de 21 de ani care prezenta o hemoragie asociată cu anemie, trombocitopenie, leucopenie și măduvă osoasă galbenă, acelulară. El a atras atenția asupra scăderii producției de celule sanguine ca defect primar. Termenul de anemie aplastică a fost utilizat de Chauffard în 1904. De atunci s-au descris sute de cazuri, recunoscându-se că sub denumirea de anemie aplastică sunt grupate diverse modalități de expresie clinică având etiopatogenie, evoluție și prognostic diferite. Datorită faptului că examenul citologic al măduvei osoase a fost introdus după 1930 și cel bioptic după 1950, un timp îndelungat au circulat numeroși termeni ca anemie aregenerativă, aleukie hemoragică, panmieloftizie, anemie toxică paralitică ș.a., pentru a desemna aceeași afecțiune hiporegenerativă a măduvei osoase.

Frecvență. Anemia aplastică este o afecțiune rară, cu o frecvență de 5 cazuri noi la 1 milion de locuitori, pe an. Boala apare la toate vârstele între 2 și 80 ani, dar are o incidență mai mare la tineri (cu excepția formei secundare unei chimioterapii anticanceroase). Raportul dintre bărbați și femei este aproximativ egal.

Etiologie. Anemia aplastică poate fi congenitală sau dobândită. Dintre cele dobândite, cel puțin 50% sunt de cauză necunoscută (în SUA 40—70%, în Japonia 90%). În cazuistica noastră, 75% din aplaziile me-

dulare sunt idiopatice. Această situație este mai frecventă la persoanele în vârstă (16).

Dificultatea de a stabili un agent cauzal provine din observația că din numeroase persoane expuse la acțiunea aceluiași factor numai câteva fac aplazie medulară. În plus, intervine și faptul că, în condițiile vieții moderne, aceeași persoană este expusă simultan la mai mulți agenți considerați aplazianți (tabelul 23.I).

TABELUL 23.I

Factori etiologici ai aplaziilor medulare și profesiuni cu risc

I. *Radiații ionizante* la care sunt expuși: medici și tehnicieni radiologi, radioterapeuți, lucrători cu radioizotopi (preparare, utilizare), lucrători la ciclotron, centrale atomo-electrice, muncitori la extracția uraniului.

II. *Hidrocarburi aromatice* (benzen, toluen, xilen, crezol, naftalen); gudron de țiței și produse de rafinare; trinitrotoluen; kerosen; solvenți (stoddard solvent), cleiuri și cimenturi cu uscare rapidă (prenadez etc.), utilizate în extracția sau rafinarea țițeiului; șoferi, mecanici auto, profesiuni în care se spală piese metalice cu petrol sau fracțiuni de petrol; industria ce folosește solvenți ai cauciucului, rășinilor și alcaloizilor; industria de medicamente, vopsele și explozivi; industria prelucrării pieilor artificiale sau naturale, a emailurilor, cauciucului, materialelor impermeabile, lacurilor și vopselelor, produselor care îndepărtează sau diluează vopseaua („tiner"), lichidelor care bronzează, argintează sau auresc, a bateriilor, a linoleurilor și celuloidului; litografie, fotografie, curățătorie chimică, prelucrarea penelor; industria aeronautică.

III. *Insecticide:* gamabenzen hexaclorid, chlordane, chlorphenazone (DDT), parathion, pentaclorfenol.

IV. *Medicamente.* A. Cunoscute a fi asociate în aplazii medulare: cloramfenicol, pirazolone (Fenilbutazona, Aminofenazona, Fehinizon, Tomanol); analogi hidantoinici (Mezantoin, Fenitoin, Trepal, Primidon, Fenacemid); sulfonamide (Sulfametin, Neoxazol, Sulfatiazol); sulfonilureice (Tolbutamid, Diabinese); săruri de aur (Solganal B, Tauredon), de bismut, mercur; arsenicali organici, quinacrine (Mepacrin, Atebrin); D-penicilamină, citostatice (agenți alkilanți, antimitotice, antimetaboliți).
B. Posibil asociate cu aplazii medulare: antihistaminice (Feniramin), fenotiazine (Emetiral, Clordelazin, Plegomazin, Romtiazin), Napoton, Meprobamat, colchicină, chinidină, salicilați, indometacin, meticilină, Streptomicină, Penicilină, Efitard, Ederen, Diamox, Ulcosilvanil, Carbimazol, Metiltiouracil, estrogeni.

V. *Alte substanțe chimice:* vopsele de păr, cosmetice, dezodorizante, insecticide.

VI. *Hepatita virală;* alte viroze (mononucleoza, gripa, citomegalovirus, parvovirus B_{19}, HIV).

VII. *Factori imunologici:* anticorpi anticelule stem sau antifactori reglatori. Limfocite cu acțiune citotoxică.

VIII. *Graviditate.*

IX. *Hemoglobinurie paroxistică nocturnă*, timom.

X. *Reacția grefă împotriva gazdei* (GVHD).

XI. *Congenitale* — aplazia global Fanconi etc.

În condițiile actuale, agentul cauzal este incriminat numai prin asociere: nu există un test de laborator cu valoare de predicție a afectării celulelor stem de către un toxic. Cu toate acestea, trebuie insistat pentru găsirea unor agenți cauzali printr-o analiză minuțioasă a condițiilor de muncă și de viață, a obișnuinței de a folosi medicamente considerate inofensive.

Toxicele chimice și medicamentele. Acțiunea lor asupra hematopoiezei este legată de doză sau este de natură alergică. Doze mari de benzen, iradiere sau citostatice sunt urmate invariabil de aplazie medulară. Dozele uzuale de cloramfenicol sau fenilbutazonă pot da aplazie la 1 din 10 000 de pacienți.

Benzenul este cunoscut de multă vreme ca mielotoxic. Este utilizat în industria solvenților organici fiind foarte volatil și intră în compoziția solvenților de vopsele, kerosenului, degresorilor etc. Modul de acțiune pare să fie prin inhibarea sintezei ADN în celulele medulare diferențiate și prin lezarea celulelor formatoare de colonii granulocitomonocitare (CFC-GM). Anomaliile hematologice mai des întâlnite sunt anemia hemolitică, mielofibroza cu metaplazie mieloidă, limfopenia, leucemia acută mieloblastică, dar cea mai frecventă este pancitopenia datorită hipoplaziei medulare sau cu măduvă hiperplazică, dar ineficientă (29).

Pancitopenia poate să apară la distanță de ani după expunerea la benzen, dar asemenea reacții întârziate pot fi simple coincidențe. În cele mai multe cazuri, depresia medulară apare la scurt timp după expunere, cu o relație strânsă între cantitatea toxicului și durata expunerii, pe de o parte, și severitatea depresiei medulare, pe de altă parte. Dezvoltarea ulterioară a leucemiei la pacienți cu pancitopenie cu măduvă hiperplazică, ineficientă, a făcut ca benzenul să fie considerat agent cu potențial leucemogen.

Cloramfenicolul este medicamentul cel mai cunoscut pentru acțiunea sa aplaziantă. Incidența anemiei aplastice este de 1 la 20 000—60 000 de subiecți tratați cu cloramfenicol. Anemia poate apărea uneori după 1—2 luni sau mai mult de la folosirea antibioticului. În mod obișnuit, cloramfenicolul are o acțiune de inhibare a sintezei de proteine și de scădere a activității ferochelatazei (92), urmată de anemie. Acțiunea aplaziantă a cloramfenicolului nu este legată de doză. S-a arătat că, la pacienții în remisiune după aplazie medulară indusă de cloramfenicol, inhibiția sintezei de ADN în celulele măduvei osoase se produce cu doze mai mici decât dozele necesare pentru aceeași inhibiție a ADN la persoanele normale. Mai recent s-a dovedit că nucleul nitrobenzenic al cloramfenicolului dă naștere la nitrozocloramfenicol printr-un proces de sinteză reducțională (92). Derivatul nitrozo are o acțiune de inhibare a sintezei de ADN mult mai intensă decât cloramfenicolul, acțiune care nu este reversibilă prin îndepărtarea drogului. Acțiunea citotoxică asupra celulelor stem hematopoietice poate avea loc prin interacțiunea cu ADN sau prin declanșarea unui răspuns imun (73), posibil prin alterarea antigenelor de suprafață a celulelor stem de către droguri. Această reacție ar fi posibilă prin: *a)* un metabolism anormal al drogului; *b)* o anomalie genetică a celulelor stem și/sau o afectare anterioară a acestora; *c)* o reacție imună ce interesează drogul; *d)* o lezare coincidentă a celulelor stem făcându-le sensibile la drog (87); *e)* afectarea micromediului hematopoietic (62). Le-

zarea măduvei osoase de către cloramfenicol poate avea la bază și o predispoziție genetică. Sunt cunoscute apariția aplaziei medulare la gemeni monozigoți și faptul că măduva ascendenților pacienților prezintă o afectare a sintezei ADN, similară cu cea a copiilor (92).

Alte medicamente cu risc de producere a anemiilor aplastice sunt fenilbutazona și oxifenilbutazona (40, 75). Mecanismul lor de acțiune a fost mai puțin studiat. S-a arătat că acetanilida, care este metabolizată de aceeași enzimă hepatică oxidativă, ca și fenilbutazona, are un *clearance* (prelungit la pacienții cu anemie aplastică indusă de fenilbutazonă (23), sugerând că fenilbutazona ar acționa asupra celulelor stem prin realizarea unor niveluri sanguine crescute în condițiile unui deficit enzimatic hepatic.

Dată fiind gravitatea anemiilor aplastice ar fi utilă testarea *in vitro* a sensibilității celulelor stem la acțiunea drogurilor. S-au făcut propuneri în acest sens, au fost imaginate teste corespunzătoare, dar un asemenea program este nerealizabil în practică din cauza costului foarte ridicat. Mult mai eficientă este renunțarea la folosirea drogurilor cu potențial de leziuni aplazice. În primul rând, cloramfenicolul ar trebui scos din uz sau folosit numai în cazuri de excepție, așa cum s-a procedat în multe țări.

Iradierea este considerată o cauză a anemiilor aplastice, deoarece s-a observat că pacienții iradiați pentru spondilită anchilozantă au o incidență a anemiei aplastice de 40 de ori mai mare decât populația generală. De asemenea, în SUA s-a constatat că radiologii fac anemie aplastică de 20 de ori mai frecvent decât restul populației (16). Recent s-a observat un număr crescut de anemii aplastice după accidentul nuclear de la Cernobâl. Cu toate acestea, supraviețuitorii bombardamentului atomic de la Hiroșima și Nagasaki se comportă, în ce privește anemia aplastică, la fel cu populația generală.

Infecția cea mai frecvent incriminată în anemia aplastică este hepatita acută virală. Aproximativ 0,3—0,5% din cazurile de anemie aplastică apar după o hepatită francă (de obicei non-A, non-B). La 2% din cazurile de hepatită non-A, non-B (recent confirmate ca hepatită C) apare o anemie aplastică, care are câteva trăsături particulare: a) cei mai mulți pacienți sunt bărbați tineri; b) semnele de aplazie medulară apar cam la 2 luni de la episodul acut; c) prognosticul este în general nefavorabil (38). Într-un studiu, din 174 cazuri, peste 90% din pacienți au decedat în decurs de 1 an de la stabilirea diagnosticului. Această evoluție gravă a determinat recomandarea precoce a transplantării de măduvă osoasă. De reținut că 25% din pacienții cu anemie aplastică au alterări funcționale hepatice în momentul diagnosticului, reflectând infecții subclinice sau expuneri la droguri hepatotoxice. Ipoteza după care disfuncția hepatică poate duce la o tulburare a detoxifierii față de un agent potențial mielotoxic nu a fost confirmată. Este posibil ca virusul hepatitei să interfereze cu funcția de autoperpetuare a celulelor stem, prin scăderea numărului de limfocite T, creșterea proporției de limfocite T supresoare sau activarea limfocitelor cu producerea de γ-IFN, deprimant al hematopoiezei. La 6 din 11 pacienți cu anemie aplastică post hepatică acută s-au pus în evidență antigeni HLA-B8, asociați de asemenea cu hepatita autoimună. Datele existente sunt în favoarea unui mecanism imunologic

al anemiei aplastice după hepatita virală și nu pentru acțiunea direct citotoxică asupra celulelor hematopoietice.

Un alt virus identificat ca agent etiologic în anemia aplastică este *parvovirusul B 19*. Acesta se replică numai în celulele medulare eritroide, fapt demonstrat in *vivo* și in *vitro*, în culturi de măduvă osoasă și ficat fetal. În consecință, celulele progenitoare eritroide — CFC-E și CFC-EB — sunt intens afectate de virus (90 a).

Infecția acută cu parvovirus B 19 produce la copil așa-numita boală a cincea exantematică, caracterizată prin eritem facial și erupție macropapulară pe trunchi și membre, proximal. Manifestările de boală sunt ușoare, dar contagiozitatea este mare. La adult, mai obișnuite sunt durerile articulare sau chiar o artrită francă. Contractarea bolii de un pacient cu hemoliză cronică și eritropoieză hiperactivă (sferocitoză ereditară, siclemie, talasemie, enzimopatii, defecte de membrană eritrocitară) poate avea ca rezultat o *criză aplastică pasageră*. Multe din cazurile de crize aplastice au apărut la bolnavi spitalizați deoarece virusul este ușor transmis nosocomial. Multiplicarea virusului în celulele medulare eritroide duce la distrucția acestora până când se dezvoltă imunitatea antivirală.

În formele cronice de boală, parvovirusul B 19 persistă, în lipsa unui răspuns imun adecvat cu anticorpi neutralizanți ai virusului. Se realizează o *aplazie eritroidă pură*, posibilă la pacienți cu imunodeficiențe congenitale sau dobândite, ca în leucemia limfatică cronică, leucemia limfoblastică acută, neoplaziile tratate cu droguri citotoxice, sindromul imunodeficienței dobândite (SIDA). În lipsa răspunsului imun lipsesc semnele mediate de complexele imune, atât eritemul cât și poliartrita. Diagnosticul sugerat de semnele citopatice ale infecției cu parvovirus B 19, ca prezența de pronormoblaști giganți în măduva osoasă, este confirmat de punerea în evidență a virusului prin tehnicile de hibridizare a ADN.

Sunt cunoscute și alte virusuri care pot da depresie hematopoietică, ca virusul Epstein—Barr, citomegalovirusul (52).

În tuberculoză, inclusiv în cea provocată de micobacterii atipice, în bruceloză și boli parazitare, pancitopenia este de obicei secundară distrucției periferice și hipersplenismului. De fapt, este dificil de stabilit dacă o infecție produce anemia aplastică, dacă este consecința citopeniei din cursul aplaziei sau dacă aplazia este rezultatul terapiei antiinfecțioase.

Anemia aplastică în cursul sarcinii a fost semnalată în unele cazuri ca un eveniment tranzitoriu posibil corelat într-un fel cu sarcina. În alte cazuri, când sarcina a apărut la femei cu anemie aplastică, evoluția bolii a fost nefavorabilă, cu deteriorare rapidă, constituind de obicei o indicație de întrerupere a sarcinii. Au fost comunicate însă și cazuri în care un avort spontan sau o naștere normală au dus la remisiunea unei anemii aplastice care dura de mai mulți ani (10 a, 34). O asemenea evoluție nu a putut fi clar explicată, dar a fost pusă pe seama unor modificări hormonale proprii sarcinii. Unele studii experimentale au arătat că hormonul pituitar, prolactina, precum și plasma șoarecilor femele gravide sau cu lactație au efect stimulator asupra eritropoiezei (48).

Au fost relatate rare cazuri de anemie aplastică în asociere cu insuficiența pancreatică, fasciita difuză și lupusul eritematos sistemic. Remisiunea bolii lupice prin corticoterapie și azatioprină este urmată uneori

de revenirea la normal a hematopoiezei. Recidiva lupusului într-un caz, prin întreruperea tratamentului, a dus la revenirea anemiei de tip aplazic.

S-au observat cazuri de anemii aplastice la copii cu sindroame de imunodeficienţă congenitală severă după transfuzii de sânge. Aplazia medulară a fost atribuită acţiunii supresoare a limfocitelor din sângele donatorului asupra celulelor stem din măduva primitorului în imposibilitate de a respinge limfocitele agresoare.

Relaţia dintre anemia aplastică, hemoglobinuria paroxistică nocturnă şi leucemie va fi discutată la complicaţii.

Patogenie. Cele mai multe date converg către o patogenie a anemiilor aplastice prin lezarea celulelor stem hematopoietice. Evenimentul central este diminuarea, uneori până aproape de dispariţie, a celulelor stem pluripotente. Culturile *in vitro* au demonstrat reducerea numărului de celule progenitoare hematopoietice (CFC-E, CFC-EB, CFC-GM şi CFC-GEMM). Nivelul scăderii cantitative a acestor celule este direct proporţional cu gravitatea bolii. Deoarece, de obicei, limfocitele rămân numeric şi funcţional normale, este posibil ca leziunea să fie de fapt cantonată la nivelul celulelor progenitoare mieloide, lăsându-le intacte pe cele limfoide, cel puţin la începutul bolii.

Indiferent de cauză, efectul este disfuncţia sau diminuarea celulelor stem. Lezarea celulelor stem în anemiile aplastice este calitativ deosebită de mielodepresia pasageră, în relaţie directă cu doza, care apare după administrarea terapeutică a citostaticelor. În cele mai multe cazuri de anemii aplastice, celulele stem hematopoietice rămân permanent în număr foarte redus, chiar în perioadele de remisiune.

Compartimentul celulelor stem este considerat inepuizabil. Totuşi, din experienţele pe animale, a reieşit că refacerea celulelor stem după o acţiune toxică, repetată, este din ce în ce mai puţin exprimată, ducând în cele din urmă la aplazia ireversibilă (41). De asemenea, expuneri repetate la citostatice active în afara ciclului celular, cum sunt Myleranul şi Nitrozoureea, duc la reducerea prelungită şi adesea ireversibilă a celulelor stem (53). Este posibil ca pancitopenia periferică să apară atunci când capacitatea de regenerare a celulelor stem pluripotente a scăzut, prin influenţări repetate ale toxicelor, sub nivelul de 10% necesar susţinerii compartimentului precursorilor hematopoietici. Aceştia din urmă, cantonaţi în mici insule de hematopoieză restantă, devin hiperactivi, cu un tranzit celular rapid, explicând producerea macrocitelor *(stress erythrocytes)* şi creşterea nivelului hemoglobinei fetale (2).

Faptul că din numeroase persoane expuse la acţiunea unui factor etiologic numai câteva fac anemie aplastică pune în discuţie existenţa unei sensibilităţi individuale particulare a celulelor stem. Această sensibilitate poate fi cauzată de un deficit genetic sau dobândit în eliminarea sau detoxifierea unor substanţe nocive, inclusiv medicamente (29). Este posibil ca unii subiecţi să prezinte o stare de „aplazie latentă", aşa cum şoarecii trataţi cu Myleran până la inducerea unei aplazii asimptomice au celulele stem foarte sensibile la acţiunea cloramfenicolului (60).

La şoareci există două tipuri de anemie aplastică congenitală: unele animale au un defect al celulelor stem (W/W^v), altele au un micromediu inadecvat (Sl/Sl^o). La şoarecii Sl/Sl^d transplantarea de celule medulare normale nu este capabilă să restaureze hematopoieza (4). Succesele ob-

ținute prin transplantarea de celule medulare în anemiile aplastice la om (4, 16, 75) au făcut să se creadă că este foarte puțin probabilă patogenia prin defect al micromediului (12, 75). În același sens sunt interpretate și nivelurile scăzute ale precursorilor hematopoietici (CFC-GM și CFC-E) în măduva și sângele celor mai mulți pacienți (10, 76), precum și absența anomaliilor ultrastructurale în stroma medulară (70). Cercetări recente au încercat să explice modul de producere a anemiei aplastice la șoareci Sl/Sl^d. Deficitul mediului hematopoietic caracteristic acestor animale se datorește acțiunii celulelor NK asupra fibroblaștilor, care, astfel, nu mai secretă ligandul c-kit, factorul stimulator al celulelor stem pluripotente. Eliminarea citotoxică a celulelor NK a avut în aceste cazuri ca rezultat restaurarea completă a celularității medulare (65 b).

Patogenia imună a anemiilor aplastice se bazează pe argumente clinice, experimentale și de laborator. O primă observație clinică a fost refacerea spontană, autologă a măduvei osoase a pacienților cu anemie aplastică după rejectarea grefei alogene de celule hematopoietice. Pentru ca celulele transplantate să se grefeze, se face o imunosupresie intensă (chimioterapie plus iradiere totală) a gazdei. Respingerea grefei ar fi trebuit să ducă la moartea subiecților, dar o parte din aceștia au revenit la normal. S-a interpretat că, prin tratamentul intens de condiționare a gazdei pentru acceptarea grefei, s-au interceptat căi patogenice imune permițând dezvoltarea puținelor celule stem care au supraviețuit imunosupresiei. O asemenea patogenie a apărut evidentă și în cazurile de anemie aplastică la care s-a făcut o transplantare de măduvă izogeneică, de la un geamăn identic. În 50% din cazuri a fost necesară imunosupresia pentru prinderea grefei, dovedind că anemia aplastică la acest grup era produsă de un mecanism imunologic.

Un argument clinic este eficacitatea tratamentelor imunosupresoare (globulină antitimocitară, timectomie, chimioterapie, ciclosporină A) cu refacerea hematopoiezei în mai mult de jumătate din totalul cazurilor de anemie aplastică.

Din argumentele de laborator, mai importante sunt de reținut:

a) Punerea în evidență a anomaliilor limfocitare atât a limfocitelor B (nivel scăzut al producției de imunoglobuline *in vitro),* cât mai ales a limfocitelor T. Activitatea proliferativă a limfocitelor la stimularea cu antigeni specifici, ca toxina tetanică și *Candida* sau mitogeni ca *pokeweed* sau concavalina A este scăzută la pacienții cu anemie aplastică. De mare importanță este modificarea raportului între subseturile de limfocite T, CD4 (T_H)/CD8 (T_S), care de la valoarea normală de 2 ajunge la mai puțin de 1 (54, 88). Pe seria de bolnavi urmăriți în Clinica de hematologie, raportul T_H/T_S a fost în medie de 0,8, cu limita inferioară până la 0,4. Alterarea acestui raport al subpopulațiilor de limfocite T se face de cele mai multe ori prin scăderea numărului de T_H sau prin creșterea T_S, cât și prin ambele modalități deodată (93). Limfocitele T activate (CD8, Tac$^+$, HLA-Dr$^+$) eliberează cantități crescute de interferon și interleukină-2 care suprimă creșterea precursorilor hematopoietici. Activarea limfocitelor se face ca urmare a infecțiilor virale, contactul cu toxice chimice sau medicamente. Activarea este mai intensă la pacienții transfuzați și apare la 24 de ore după prima transfuzie. În același timp cu activarea limfocitelor T crește și numărul de celule NK, precum și

de celule cu receptori Fc pentru IgG. Este posibil ca alosensibilizarea indusă de transfuzii să complice procesul morbid prin stimularea unui număr crescut de celule cu potențial de activitate supresoare a hematopoiezei (85). S-a arătat de asemenea că interleukina-1 inhibă proliferarea precursorilor eritroizi prin acțiunea asupra eritropoietinei și este posibil ca acest efect să intervină în unele forme de aplazie eritroidă (72).

b) Rezultatele în culturi de precursori hematopoietici constituie un alt argument important pentru un mecanism imun. Limfocitele pacienților cu anemie aplastică inhibă dezvoltarea coloniilor granulomonocitare și eritroide *in vitro*. Rolul supresor asupra celulelor medulare formatoare de colonii a fost evidențiat fără dubii *in vitro* în culturile în care au fost utilizate limfocite autologe (65). Experimente interesante au arătat că îndepărtarea limfocitelor T din suspensia de celule medulare de la pacienți cu anemie aplastică duce la o favorizare a creșterii coloniilor eritroide (CFC-E), iar introducerea în cultură a limfocitelor T autologe are ca rezultat o diminuare a numărului de colonii eritroide (83). Depleția măduvei osoase de limfocitele T a fost obținută prin incubarea măduvei cu globuline antilimfocitare (80). Reacții alo- și autoimune au fost demonstrate la 117 pacienți cu anemie aplastică severă (89).

c) Acțiunea imunosupresoare prin anticorpi, asociată cu cea mediată celular, pledează de asemenea pentru o patogenie imună a anemiilor aplastice.

Alte date provin din studiile asupra aplaziilor eritroide pure, prima dintre afecțiunile din acest grup în care s-au obținut dovezi cu privire la un mecanism patogenic autoimun și la care tratamentul imunosupresiv a fost eficace. Două modalități patogenice au fost puse în evidență: una prin imunosupresie mediată celular și cealaltă prin acțiunea anticorpilor.

Cea mai frecventă boală asociată cu aplazia eritroidă pură este leucemia limfatică cronică de tip T. În unele cazuri, supresia eritroidă a fost consecința interacțiunii dintre progenitorii eritroizi și limfocitele T maligne (44); alteori, acțiunea limfocitelor T maligne a fost îndreptată atât împotriva precursorilor eritroizi, cât și asupra sintezei de Ig, deci a limfocitelor B (61).

În marea majoritate a cazurilor descrise în literatură au fost identificați anticorpi din clasa IgG operând la mai multe niveluri de dezvoltare a seriei eritroblastice, incluzând eritroblaștii, dar mai ales progenitorii eritroizi, ca CFC-EB (56). A fost recunoscut și un efect împotriva receptorilor de suprafață pentru factorii de maturație eritroidă. Aceste mecanisme dependente de complement se întâlnesc și în varietatea de aplazie eritroidă pură, asociată cu timoame, LES, anemie hemolitică autoimună, leucemie granulocitară cronică, mielofibroză.

Mecanisme imune au fost puse în evidență și în aplazia eritroidă congenitală (anemia Diamond-Blackfan), iar terapia imunosupresivă cu steroizi sau de alt tip a fost urmată uneori de remisiune tranzitorie. În aplazia granulocitară s-au demonstrat de asemenea reacții autoimune împotriva progenitorilor medulari, ca CFC-GM (30), cu anticorpi de tip IgG și IgM, sau prin limfocite T supresoare. Aceste aplazii sunt de obicei secundare artritei reumatoide sau LES.

În concluzie, anemiile aplastice mediate imun pot apărea în boli asociate cu dezordini imunoreglatoare (LES, arterită cu celule gigante, ar-

trită reumatoidă) sau cu imunodeficiențe (timom cu hipogammaglobulinemie), după activarea celulelor imunologice competente prin infecții virale (Epstein-Barr, hepatita acută, citomegalovirus, parvovirusuri), toxice chimice sau după administrarea de medicamente imunomodulatoare (interferon, interleukin-2), precum și în cazul expansiunii clonale sau neclonale a limfocitelor T și celulelor NK (leucemia limfatică cronică, timom, rejecția grefei de organe etc.).

Anemia aplastică nu este o boală autoimună în sens clasic. Dezvoltarea bolii pe un teren predispus genetic este sugerată de faptul că în remisiune măduva nu revine la normal. Persistă trăsături mielodisplazice, capacitatea de proliferare a celulelor precursoare în cultură este redusă, reparația ADN este afectată. Elementele de mielodisplazie sunt evidente uneori de la început, ceea ce face ca diagnosticul diferențial între anemia aplastică și mielodisplazie să fie adesea imposibil, sugerând că ambele sunt manifestări ale unei boli unice (65 *a*).

Tabloul clinic este dominat de semnele și simptomele anemiei, leucopeniei și trombocitopeniei și îndeosebi de severitatea acestora. Debutul este variabil, de cele mai multe ori insidios, cu simptome generale (oboseală, fatigabilitate, cefalee, inapetență, paloare, slăbire, uneori palpitații, dispnee de efort) pentru care pacientul nu solicită în general consult medical. Apariția purpurei pe gambe, a echimozelor după traumatisme mici sau a altor manifestări hemoragice ca epistaxis, gingivoragii, metroragii, hemoragii retiniene, hemoragii prelungite după traumatisme mici, extracții dentare, determină de obicei prezentarea la medic. În acest moment pot fi puse în evidență infecții, îndeosebi ale cavității bucale, perianale, cutanate sau ale tractului respirator. Sindromul hemoragic nu devine evident decât atunci când numărul de trombocite scade sub 20 000/μl, dar poate fi prezent și la un număr mai mare de trombocite dacă se asociază o infecție. De regulă nu se găsesc splenomegalie, hepatomegalie sau adenopatii. Splenomegalia poate apărea mai târziu în evoluție, ca urmare a hemosiderozei sau după o hepatită acută posttransfuzională.

Examene de laborator. Citopenia pusă în evidență de examenul sângelui nu are nimic caracteristic. Severitatea acesteia este variabilă de la un caz la altul. Anemia este prezentă întotdeauna de la începutul bolii, trombocitopenia de cele mai multe ori, iar leucopenia poate lipsi. De fapt, leucopenia constă în granulocitopenie, cel puțin la începutul bolii, pe parcurs adăugându-se și limfopenia. Granulocitopenia absolută poate ajunge până la valori sub 200/μl, când riscul de infecție este iminent.

Nivelul scăzut de trombocite este mai bine tolerat de copii, la care valori în jur de 5 000/μl pot să nu fie însoțite de purpură. Din punct de vedere morfologic, celulele de pe frotiu nu prezintă nimic deosebit util diagnosticului. Se notează uneori macrocitoză, iar neutrofilele pot avea granulații azurofile mari. Acestea din urmă, împreună cu o fosfatază alcalină leucocitară foarte ridicată, pot fi expresia unui proces infecțios, adeseori prezent în anemia aplastică.

În cele mai multe cazuri este prezent un număr redus de reticulocite exprimate printr-un indice de producere mai mic de 1. Multe dintre reticulocite sunt mari, reflectând un nivel crescut de eritropoietină, un timp de tranzit al măduvei osoase redus și producerea de „eritrocite de stres".

Uneori, în cazurile mai puțin severe, când se mai păstrează zone de hematopoieză normală sau chiar hiperactivă în măduvă, reticulocitele pot ajunge la valori aproape normale, prin eliberarea prematură în circulație. O hematopoieză extramedulară nu există în anemia aplastică și deci nici eritroblaști circulanți în sânge. Sideremia este mult crescută, cu o legare a transferinei aproape completă, ca urmare a lipsei țesutului eritropoietic. Feritina are valori mult crescute, ca expresie a nivelului crescut de fier depozitat în macrofage. Din același motiv, *clearance*-ul radiofierului plasmatic este mult întârziat și dozările eritropoietinei arată cele mai crescute valori întâlnite în anemii, pentru o aceeași concentrație a hemoglobinei. Cantitățile mari de eritropoietină excretată zilnic determină folosirea urinei acestor pacienți pentru prepararea concentratelor de eritropoietină.

Aprecierea cantitativă a măduvei hematopoietice prin încorporarea în macrofage a technețiului radioactiv poate oferi o imagine a extensiei aplaziei măduvei osoase.

De asemenea, o apreciere a extinderii țesutului adipos în măduvă poate fi obținută prin imaginea de rezonanță magnetică (49 a).

Măduva osoasă apare hipocelulară la aspirație, pe frotiu remarcându-se doar rare celule ale parenchimului hematopoietic, cele mai multe celule fiind reprezentate de limfocite, macrofage, mastocite, adipocite, fibroblaști. Absența durerii la aspirația măduvei este un prim semn de „puncție albă". Uneori pot fi obținuți prin aspirație câțiva grunji prin a căror strivire se poate obține un frotiu cu celule hematopoietice cantitativ normale. O astfel de falsă imagine normală, ca și posibilitatea ca puncția „albă", acelulară, să fie datorată densității foarte mari a celulelor din măduva osoasă a unor leucemii acute, limfoame, metastaze neoplazice, face indispensabilă puncția biopsie a măduvei osoase. Deși se prelevează un fragment mic dintr-un organ de mărimea măduvei și dintr-o zonă — tuberozitatea posterioară a iliacului — cu o cantitate sporită de grăsime, biopsia de măduvă osoasă oferă o imagine mai fidelă asupra intensității hipoplazei, a bogăției țesutului adipos de înlocuire, a celularității restante. Exprimarea hipoplazică în urma examenului histologic al fragmentului de măduvă osoasă se face procentual față de normal, global și pe diversele serii celulare. Prezența unor focare de hematopoieză, care pot fi interpretate atât ca elemente încă supraviețuitoare ale măduvei osoase afectate de o cauză cunoscută sau nu, ori ca semne de regenerare, oferă un element de interes terapeutic, justificând utilizarea androgenilor.

O a doua puncție în spina iliacă posterosuperioară contralaterală reduce posibilitatea unei greșeli dată de micimea eșantionului. Hemosiderina — la coloratia Perls — este depozitată în cantități mari în macrofagele medulare.

Diagnosticul anemiei aplastice se bazează pe constatarea citopeniei sanguine și a hipo- sau aplaziei măduvei osoase. Aplazia trebuie documentată prin biopsia măduvei, singura în măsură să confirme celularitatea redusă prin înlocuire cu țesut adipos și nu prin fibroză sau celule neoplazice. De o oarecare utilitate pentru diagnostic sunt splina de dimensiuni normale și absența eritroblaștilor pe frotiul de sânge. În formele congenitale se pot găsi malformații diverse.

Diagnosticul diferențial urmărește excluderea afecțiunilor care au ca manifestare comună pancitopenia (tabelul 23.II). De cea mai mare importanță este grupul bolilor cu insuficiență medulară produsă de înlocuirea parenchimului medular funcțional cu un țesut lipsit de proprietăți hematopoietice. Prin puncția aspiratorie sau bioptică se elimină toate cauzele de insuficiență medulară prin înlocuirea măduvei cu celule, fibre sau microbi, precum și carențele de factori de creștere care dau anemii

TABELUL 23.II

Cauzele pancitopeniilor

I. Insuficiență medulară prin:
  1. Aplazie medulară
  2. Înlocuirea parenchimului medular cu:
    a) Celule nefuncționale
      — metastaze neoplazice
      — leucemie acută, leucemie cu celule păroase
      — limfoame Hodgkin sau non-Hodgkin
      — mielom multiplu
      — boală Gaucher, Niemann-Pick, Letterer-Siwe
      — dismielopoieze (anemii refractare)
    b) fibroză, scleroză: mielofibroză, mielosclerozăă, osteoporoză
    c) microorganisme: tuberculoză miliară, bruceloză, legionelloză, febră Q, boli fungice diseminate, septicemie fulminantă, malarie
  3. Carențe: deficit de vitamină B_{12} și acid folic, deficit de piridoxină, anorexie nervoasă, inaniție, alcoolism

II. Hipersplenism: splenomegalie congestivă, limfoame, leucemii, boală Gaucher, Niemann-Pick, sarcoidoză, Kala-Azar ș.a.

III. Hemoglobinuria paroxistică nocturnă, coagulopatia de consum.

de tip macro-megaloblastic. Afecțiunile care se manifestă cu pancitopenie de cauză periferică, presupun existența splenomegaliei, condiție care exclude aplazia medulară. Hemoglobinuria paroxistică nocturnă poate să coexiste cu aplazia medulară în diverse moduri. Testul HAM pozitiv și prezența hemosiderinuriei sunt semne ale HPN cu criză aplastică; pozitivitatea țesutului cu sucroză ar atesta prezența unei clone HPN la un pacient aplazic. De cea mai mare dificultate este diferențierea anemiei aplastice de mielodisplazia hipoplastică, în care pe fondul hipoplazic al măduvei se pot distinge elemente morfologice anormale: precursorii eritroizi sunt megaloblastoizi, cu modificări de formă a nucleului, iar hemosiderina este abundentă în mitocondrii; precursorii granulocitari pot avea modificări nucleare de tip Pelger-Huët.

Formele clinice ale anemiei aplastice pot fi grupate în funcție de evoluție (acută sau cronică), gravitate sau gradul de extensiune a bolii la una sau mai multe serii celulare sanguine.

Formele cronice sunt cele mai obișnuite. Anemia aplastică acută (tranzitorie) este proprie seriei eritroblastice și va fi tratată în continuare.

După gravitate, anemiile aplastice globale se împart în forme ușoare, medii și severe. Pentru atenția care trebuie să i se dea din punct de vedere prognostic și terapeutic, forma severă a fost individualizată pe criterii precise (tabelul 23.III). Circumscrierea acestei forme clinice este ne-

TABELUL 23.III

Criterii pentru definirea anemiei aplastice severe (16)

Sânge periferic (cel puțin două din următoarele):
1) Granulocite $<500/ml$
2) Trombocite $<20\,000/ml$
3) Anemie cu reticulocite $<1\%$ (corectate pentru hematocrit)

Măduva osoasă (unul din următoarele):
1) Celularitate $<25\%$ din normal
2) Celularitate $<50\%$ din normal, peste 70% din celulele restante fiind nehematopoietice

cesară deoarece asupra ei se concentrează tot efortul terapeutic. Recent a fost individualizată o formă supraacută de boală, cu o evoluție de regulă fatală. Formele medii și ușoare nu sunt atât de riguros delimitate, lăsând la aprecierea clinicianului încadrarea pacientului în una din aceste variante. Orientativ, în formele medii se încadrează cazurile de granulocite între 500 și 1 000/ml și trombocite sub 50 000/ml.

Din punctul de vedere al extensiei afectării hematopoiezei, aplaziile medulare pot fi globale sau parțiale, fiecare dintre acestea având forme dobândite sau congenitale (tabelul 23.IV).

TABELUL 23.IV

Anemii aplastice

1. Anemiile aplastice globale (pancitopenice)
   a) dobândite: secundare și idiopatice
   b) congenitale: anemia Fanconi cu malformații multiple
2. Anemii aplastice parțiale
   a) eritrocitare: dobândite; congenitale (anemie Diamond-Blackfan)
   b) granulocitare: dobândite (agranulocitoză); congenitale (disgenezia reticulară, sindromul Schwachman-Diamond)
   c) megacariocitare: dobândite; congenitale (sindromul radiusului absent)

ANEMIILE APLASTICE GLOBALE DOBÂNDITE

Sunt cele ce au fost tratate în acest capitol.

ANEMIA APLASTICĂ GLOBALĂ CONGENITALĂ

Descrisă de Fanconi în 1927, devine manifestă în prima decadă de viață și este asociată cu malformații ca pigmentații ale pielii, hipoplazia rinichilor, absența sau hipoplazia policelui sau radiusului, microcefalie,

microftalmie, strabism, hipogenitalism ş.a., întârziere mentală şi sexuală. Anemia este normocitară, uneori macrocitară, însoţită de granulocitopenie şi trombocitopenie. Boala este transmisă autosomal recesiv, ceea ce explică numărul mic de bolnavi. Heterozigoţii, în număr mult mai mare, pot avea o măduvă sensibilizată, vulnerabilă la acţiunea toxicelor şi pot dezvolta anemie de tip aplastic. Pacienţii au o incidenţă mare de anomalii cromosomiale, ca rupturi de cromosomi, schimbări de cromatide şi endoreduplicare. Există teste citogenetice pentru detectarea bolii prenatal şi postnatal, precum şi a purtătorilor instabilităţii cromosomiale. Baza moleculară a defectului în repararea ADN nu este cunoscută, dar expunerea celulelor medulare la acţiunea substanţelor alkilante sau a radiaţiilor ionizante în culturi generează defecte cromosomiale.

Supravieţuirea este mai mică de 10 ani de la debut şi cei mai mulţi pacienţi decedează în decurs de 5 ani. În peste 10% din cazuri procesul aplastic evoluează spre una din variantele leucemiei acute mieloblastice sau spre o altă formă de malignitate.

APLAZIILE MEDULARE PARŢIALE

Se denumesc după seria celulară afectată: eritroidă, granulocitară sau megacariocitară.

APLAZIA ERITROIDĂ SAU ERITROCITARĂ PURĂ DOBÂNDITĂ

Se poate prezenta sub două forme:

a) **Aplazia eritroidă acută** sau **criza aplastică** apare ca un defect trecător de producţie eritrocitară autolimitat, dezvoltat în evoluţia sferocitozei eritrocitare, anemiei hemolitice autoimune, a hemolizei produsă de infecţia cu Parvovirus B 19, hemoglobulinei nocturne paroxistice. Un episod scurt de aplazie eritroidă la pacienţi cu durata de viaţă a eritrocitelor mult redusă are un efect mai intens decât în cazul unor persoane cu hematopoieză normală. Cele mai multe din aceste crize aplastice sunt produse de acţiunea distructivă a parvovirusului B 19 asupra progenitorilor şi precursorilor eritroizi din măduva osoasă. Unele cazuri apar ca un răspuns idiosincrazic la medicamente. Alte crize aplastice pot apărea în cursul pneumoniilor acute virale, parotiditei epidemice, mononucleozei infecţioase şi hepatitei acute virale. Patogenia imună este cea mai frecvent incriminată. În acelaşi timp, deficitele de acid folic, vitamină C şi proteine au un oarecare rol.

b) **Aplazia eritroidă cronică** este mai frecvent întâlnită la persoane de vârstă medie. Din cazurile relatate în literatură, o treime se însoţesc de un timom, asociaţia fiind de 2 ori mai frecventă la femei. Uneori, boala începe ca aplazie eritroidă şi evoluează spre anemia aplastică globală. Patogenia este imună în cea mai mare parte a cazurilor (vide supra). Asocierea timomului, a LES, a leucemiei limfatice cronice, detectarea anticorpilor antieritropoietină şi răspunsul bun la imunosupresie sunt argumente în acest sens. Alte cauze sunt: boli de colagen (LED, artrită

reumatoidă, artrită reumatoidă juvenilă); infecții virale (virus Epstein-Barr, hepatită C, parvovirus B 19, ultimul având un mare tropism pentru celulele progenitoare eritroide); graviditatea; medicamente (cloramfenicol, azatioprin, izoniazidă, procainamidă, fenitoin).

În unele cazuri, nu se poate decela nici o cauză (anemia aplastică idiopatică).

Diagnosticul este ușor deoarece anemia de tip aregenerativ este însoțită de diminuarea până la absență a seriei eritroblastice, cu păstrarea intactă a celorlalte serii celulare medulare.

APLAZIA ERITROIDĂ CONGENITALĂ SAU ANEMIA DIAMOND-BLACKFAN

Devine evidentă la vârste foarte mici, două săptămâni până la 1 an. Malformațiile congenitale sunt de mai mică amploare decât în anemia aplastică Fanconi și constau în defecte staturale, deformări ale policelor, strabism și uneori tulburări distrofice, ca malformații genitale, întârzieri sau opriri în dezvoltarea somatică și psihică. Modul de transmitere este autosomal-recesiv. Ceea ce se moștenește este un defect la nivelul celulelor stem, care se transmite precursorilor eritroizi (celule formatoare de colonii — CFC-E, CFC-EB). Culturile de celule medulare de la acești pacienți arată un număr foarte mic de astfel de precursori care sunt insensibili la acțiunea eritropoietinei.

În unele cazuri s-a observat o tulburare a metabolismului triptofanului cu eliminare de acid antranilic în urină. Efectul terapeutic al corticosteroizilor și evidențierea unui supresor eritroid de origine limfocitară au pus în discuție o tulburare imună, cu observația că aceasta ar putea fi rezultatul transfuziilor de sânge. Severitatea anemiei face indispensabile transfuziile de eritrocite și explică evoluția spre hemosideroză și insuficiență cardiacă.

Diagnosticul se bazează pe anemia hiporegenerativă la vârstă mică și pe măduva osoasă cu seria eritroblastică redusă până la dispariție. Cele câteva celule eritroblastice care persistă au caractere megaloblastoide. Sideremia este crescută cu capacitatea de legare a fierului saturată. Prezența unuia sau mai multor pronormoblaști giganți este un marker celular al parvovirusului B 19 și precizează diagnosticul.

APLAZIA GRANULOCITARĂ DOBÂNDITĂ SAU AGRANULOCITOZA

Se manifestă cu infecții de mare gravitate, neutropenie severă cu 200/μl, și reducerea până la absență din măduvă a celulelor seriei granulocitare. O mare parte din pacienți au o monocitoză compensatorie. Unul din pacienții noștri a avut în mod constant o monocitoză de 30—50% (600—1 000/μl), la un număr de granulocite de 2—5% (50—150/μl), până la remisiunea obținută prin tratament imunosupresor.

Mecanismul de producere este imunologic, asemănător cu cel din aplazia eritroidă dar declanșat cu o mai mare frecvență de agenți chimioterapeutici. Unii dintre aceștia — sărurile de aur, fenilbutazona, feno-

tiazinele — au o acțiune predominant mielotoxică. Întreruperea tratamentului este suficientă pentru redresare. Când mecanismul este „imunologic", simptomele neutropeniei (febra, angina) apar după câteva săptămâni de la începerea tratamentului. După tratamentul antiinfecțios este necesar tratamentul imunosupresor pentru restabilirea granulocitopoiezei.

APLAZIA GRANULOCITARĂ CONGENITALĂ SAU SINDROMUL SCHWACHMAN—DIAMOND

Devine manifestă în primul an de viață, dar uneori primele semne pot apărea mult mai târziu, în cursul primei decade. Pe lângă neutropenie în sângele periferic și absența precursorilor granulocitari neutrofili în măduva osoasă, copiii mai manifestă steatoree, ca expresie a unei insuficiențe a pancreasului exocrin, statură mică, displazie osoasă, întârziere mintală, diabet zaharat, galactozurie, realizându-se un tablou clinic asemănător cu al bolii fibrochistice. Prognosticul este agravat de faptul că în această formă de agranulocitoză nu există monocitoză compensatorie.

APLAZIA MEGACARIOCITARĂ DOBÂNDITĂ SAU PURPURA TROMBOCITOPENICĂ AMEGACARIOCITARĂ DOBÂNDITĂ

Este cunoscută prin asocierea sindromului hemoragic trombocitopenic cu absența megacariocitelor medulare. Patogenia este mediată prin autoanticorpi sau limfocite T (32).

APLAZIA MEGACARIOCITARĂ CONGENITALĂ SAU SINDROMUL TROMBOCITOPENIC CU ABSENȚA RADIUSULUI

Este rară, dar de o mare gravitate. Se manifestă la nou-născut, absența bilaterală a radiusului fiind anomalia cea mai des constatată. La aceasta se asociază malformații cardiace și renale. Deoarece radiusul, inima și megacariocitele se dezvoltă la 6—8 săptămâni de sarcină, boala poate fi rezultatul unei afecțiuni intrauterine apărută în acest interval, rubeola fiind cel mai adesea implicată (7).

Prognosticul este nefavorabil. Mai mult de jumătate din pacienți mor în primele 8 luni de viață prin hemoragie cerebrală. O parte din cei ce depășesc acest termen, mai adesea pacienții care la naștere au avut o trombocitopenie moderată se refac progresiv. Aceștia, având o parte din megacariocite păstrate, pot beneficia de pe urma splenectomiei.

Evoluție și prognostic. Evoluția anemiei aplastice este variabilă, în funcție de forma clinică. În cele mai multe din formele ușoare apare rezoluția completă a semnelor de boală. În formele medii, evoluția este de regulă de asemenea favorabilă, dar uneori o pancitopenie moderată

poate persista vreme îndelungată. Rareori boala poate lua un curs nefavorabil spre forma severă, în care cea mai mare parte a bolnavilor (70—80%) decedează prin complicații infecțioase și/sau hemoragice. Nici în această formă evoluția nu este aceeași, deoarece în unele cazuri boala are un mers rapid, acut cu sfârșit letal în câteva săptămâni sau luni, iar alteori evoluția este mai lentă, de câțiva ani. În general, pacienții cu expunere recentă la toxice medulare industriale sau medicamentoase au o evoluție mai bună decât cazurile de anemie aplastică idiopatică sau survenită după o expunere de lungă durată la acțiunea toxicelor sau radiațiilor. De asemenea, anemiile aplastice apărute după hepatita acută virală sunt de mai mare gravitate.

Uneori evoluția anemiei aplastice este imprevizibilă, în sensul că bolnavi pe cale de refacere pot face o recidivă, după cum forme grave de boală, fără altă terapie decât cea paliativă, își pot schimba cursul spre remisiune. În general, pacienții cu forme severe de boală dar care au depășit un an de evoluție, au șanse mai mari de supraviețuire îndelungată. Din acest motiv se impune o terapeutică susținută pentru a ajuta pacientul să treacă peste perioada de risc fatal maxim. În toate cazurile refacerea se face lent, trombocitele normalizându-se ultimele, uneori după doi ani de evoluție.

Complicații. În cursul evoluției pot apărea numeroase complicații, imediate sau la distanță, de gravitate variată. Se detașează prin gravitatea lor complicațiile infecțioase și hemoragice, responsabile de sfârșitul letal a 70—80% dintre bolnavii cu forme severe de boală.

Lipsa granulocitelor predispune la infecții de mare gravitate, în primul rând prin faptul că infecțiile sunt date, de cele mai multe ori, de germeni Gram-negativi *(E. coli, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Pseudomonas aeruginosa)*, virusuri (citomagalic, varicela-zoster, herpes), fungi *(Candida, Aspergillus)*, protozoare *(Pneumocystis carinii)*, *Staphylococcus epidermitis* și *aureus, Streptococcus viridans*. În al doilea rând, infecția se manifestă ca bacteriemie, fungemie, viremie, cu febră și stare toxică, adesea șoc toxic. Neutropenicul nu poate dezvolta un răspuns inflamator, de unde și lipsa sau sărăcia semnelor fizice de infecție. Celulita se manifestă prin induratie difuză dureroasă care evoluează spre necroză, pneumonia poate să nu fie evidențiată nici radiologic. Cele mai comune sedii ale infecțiilor la neutropenici sunt orofaringele, plămânul, spațiul perirectal și pielea. Infecția trebuie căutată cu perseverență deoarece numai o treime până la jumătate din numărul neutropenicilor febrili prezintă semne evidente, clinice sau microbiologice, de infecție. Radiografia toracică, hemoculturi, uroculturi sau culturi făcute din alte posibile focare de infecție sunt obligatorii. Unele examene serologice sunt utile (anticorpi antivirus Epstein-Barr, virus hepatitic, HIV). Parvovirusul B 19 se poate căuta prin hibridizarea ADN în aplazia eritroidă pură cronică. În unele centre, pentru precizarea diagnosticului etiologic al unei pneumonii se recurge la biopsia prin bronhoscopie sau prin toracotomie, dacă starea clinică a pacientului permite asemenea proceduri.

Hemoragiile pot îmbrăca cele mai diverse aspecte, de la purpură pe tegumente și mucoase, epistaxis, metroragii, până la hemoragie digestivă sau cerebromeningee. Hemoragiile apar de regulă când numărul

de trombocite scade sub 20 000/µl şi îndeosebi sub 10 000/µl. Cele mai de temut sunt hemoragiile digestive şi îndeosebi cele cerebrale, ireversibile. Există însă o toleranţă diferită a trombocitopeniei, în funcţie de vârstă: copiii tolerează bine, cu manifestări hemoragice minime, chiar valori ale trombocitelor sub 5 000/µl, în timp ce vârstnicii au o capacitate mai redusă de a se adapta trombocitopeniei. Explicaţia probabilă trebuie legată de starea diferită a sistemului vascular.

Alte complicaţii apărute în cursul anemiei aplastice, ca hepatita acută virală posttransfuzională urmată de hepatita cronică sau colestaza după tratamentul cu androgeni pot avea consecinţe mai mult sau mai puţin severe. Doi dintre bolnavii urmăriţi de noi prezintă o remisiune lungă (10—12 ani), dar cu amauroză după hemoragii retiniene. Cea mai redutabilă complicaţie la distanţă rămâne însă hemosideroza şi hemocromatoza secundară cauzată de transfuziile repetate de eritrocite. În absenţa ţesutului eritropoietic care să-l utilizeze, fierul rezultat din distrucţia fiziologică a eritrocitelor transfuzate, precum şi cel care se resoarbe în exces din cauza hipoxiei anemice, este preluat de macrofagele din măduvă, apoi de cele din ficat, pancreas, gonade, suprarenale şi în cele din urmă de celulele parenchimatoase ale acestor organe. Ciroza hepatică şi diabetul zaharat insulinodependent sunt cele mai grave consecinţe.

În evoluţia naturală a anemiei aplastice apar alte câteva complicaţii: hemoglobinuria paroxistică nocturnă, dismielopoieza şi leucemia acută.

În aproximativ 15% din cazuri, se pun în evidenţă semne de hemoglobinurie paroxistică nocturnă (HPN) într-un oarecare moment al evoluţiei. În unele cazuri, semnele de HPN rămân numai un fenomen de laborator (testul de hemoliză în mediu acid pozitiv, hemosiderinuria, fosfataza alcalină leucocitară scăzută). În altele, HPN devine o problemă clinică serioasă, astfel încât uneori este imposibil de precizat dacă boala primară a fost HPN sau anemia aplastică. Aceşti pacienţi suferă de cumularea efectelor hemolitice ale defectelor de membrană care fac eritrocitele, leucocitele şi trombocitele sensibile la acţiunea complementului, cu pancitopenia deja prezentă prin anemia aplastică. Nu există încă o explicaţie deplin valabilă a asocierii acestor două afecţiuni, dar este ştiut că ambele sunt consecinţa afectării celulelor stem. Este posibil ca în efortul de regenerare la care sunt supuse puţinele celule stem din anemia aplastică, să apară o mutaţie somatică de tip HPN, aşa cum această mutaţie poate să fie de tip dismielopoietic. S-a demonstrat că testul de hemoliză la sucroză este pozitiv atât în HPN, cât şi în anemia aplastică, numai că sensibilitatea la acest test diferă după nivelul diferenţierii eritropoietice, în sensul că este pozitiv pe eritrocite în HPN şi pe precursorii eritropoietici în 50% din cazurile de anemie aplastică, chiar în faza de remisiune (25). Nu este cunoscută semnificaţia testului la sucroză pozitiv în fiziopatologia anemiei aplastice, dar se pare că liza precursorilor hematopoietici din anemia aplastică nu apare decât atunci când celulele sensibilizate sunt expuse factorilor imunologici celulari sau umorali care induc activarea complementului (64).

Se vorbeşte de un sindrom „anemia aplastică-HPN" ca şi despre o formă aplastică a HPN. Aceasta dovedeşte asocierea frecventă a trăsăturilor caracteristice ambelor afecţiuni. De aceea, este obligator ca la orice

pacient cu anemie aplastică să se caute semnele HPN (testele de liză *in vitro*, hemosiderinuria, FAL). Fosfataza alcalină leucocitară oferă indicii cu privire la dezvoltarea unui proces HPN.

Leucemia acută, o altă modalitate de transformare a evoluției anemiei aplastice, este întâlnită în 3—5% din cazuri (5, 24). Cazurile relatate în literatură urmează o secvență a evenimentelor bine conturată. După o fază inițială de anemie aplastică, la unele din cazurile la care apare o regenerare a măduvei osoase cu restabilirea hematopoiezei, se constată semne de dismielopoieză pe una sau mai multe linii celulare, îndeosebi pe eritropoieză, realizând tablourile de anemie refractară, anemie refractară cu sideroblaști inelari, anemie refractară cu exces de blaști. Progresia spre leucemia acută are loc direct din această fază sau poate trece printr-o altă etapă a mielodisplaziei, și anume leucemia mielomonocitară cronică. Nu numai anemia aplastică globală, ci și cea eritroidă pură poate evolua spre leucemie acută, trecând printr-un stadiu de mielodisplazie (37).

Nu există încă o explicație bine fondată a acestei transformări leucemice. Un risc mai mare de transformare în leucemie acută au cazurile de anemie aplastică cu antecedente de expunere la toxice industriale sau medicamentoase și la radiații sau care au fost tratate cu androgeni și ser antitimocitar. Transformarea are loc în perioada de remisiune clinică a anemiei aplastice, în cursul căreia se pot pune încă în evidență anomalii ca trombocitopenii, măduvă hipoplazică, creștere insuficientă a precursorilor hematopoietici *in vitro*. Ipoteza după care în perioada de refacere a hematopoiezei poate să apară o clonă patologică mutantă, este susținută de studiile citogenetice. De obicei, în anemia aplastică nu există modificări cromosomiale. Într-un studiu pe 183 de cazuri cu anemie aplastică s-a arătat că 4% dintre bolnavi aveau anomalii citogenetice clonale, printre care monosomie 7 și trisomie 8, modificări tipice pentru preleucemie și leucemie. La asemenea bolnavi riscul de transformare mielodisplazică și leucemică este de 60%, față de 3% la cei fără anomalii citogenetice (5).

Intervalul dintre momentul diagnosticului de anemie aplastică și apariția leucemiei este variabil, de la câteva luni la 20 de ani. De regulă, transformarea leucemică este mult mai frecventă la bolnavi cu evoluție lungă. Prognostcul leucemiei secundare anemiei aplastice este grav, într-un singur caz din literatură obținându-se o remisiune de scurtă durată prin chimioterapie intensivă (82). În Clinica de hematologie a spitalului Fundeni au fost observate două cazuri de transformare leucemică a unor pacienți cu anemie aplastică severă. Bolnavii se aflau în remisiune, cu persistența unei trombocitopenii moderate. Revenirea anemiei și a neutropeniei după 4—5 ani de evoluție a determinat controlul bioptic al măduvei osoase, găsindu-se celularitate bogată cu semne de displazie pe toate seriile. Tratamentele încercatele au fost ineficace și după un an a fost constatată leucemia mieloblastică acută cu evoluție rapidă fatală.

Recunoașterea transformării mielodisplazice în evoluția anemiei aplastice este necesară din punct de vedere terapeutic. Imunosupresia cu globulină antitimocitară sau cu ciclosporină A are efect redus în mielodisplazie. De aceea trebuie să se recurgă la citostatice sau la tratament

cu intenție reversoare. Dacă se are în vedere transplantarea cu măduvă osoasă alogenă, în prezența clonei mielodisplazice, condiționarea gazdei pentru acceptarea grefei, făcută cu ciclofosfamidă, trebuie completată cu iradiere, în vederea eradicării clonei neoplazice (6).

Prognosticul este în general sever: infaust, când anemia aplastică nu este tratată, cu exitus prin complicații infecțioase și/sau hemoragice, și rezervat, cu supraviețuire la un an la 60—80% din bolnavii tratați cu transplant de măduvă osoasă sau cu imunosupresoare.

Prognosticul este mai bun în aplazia eritroidă pură; în forma congenitală, tratamentul cu transfuzii asociate cu chelatoare de fier asigură o durată de viață mai lungă, iar în forma dobândită terapia imunosupresoare poate realiza în circa 50% din cazuri vindecarea bolii. Prognosticul este grevat și de posibilitatea apariției unor complicații: hepatite virale posttransfuzionale, dismielopoieza și leucemia acută.

Profilaxia primară a anemiilor aplastice constă în reducerea pericolului de expunere profesională la toxice chimice și fizice, limitarea folosirii medicamentelor cu potențial aplazic și interzicerea celor cunoscute pentru efectul lor nociv, cum este cloramfenicolul.

Dacă această acțiune nu este ușor de realizat din cauza complexității factorilor implicați, cu mult mai simplă este profilaxia secundară, a recidivelor. Bolnavilor cu forme severe de boală care au supraviețuit, ca și celor ce s-au refăcut dintr-o formă medie sau ușoară, le este interzis un nou contact cu mediul de muncă sau cu medicamentele care au fost considerate nocive. Bolnavilor cu etiologie neprecizată trebuie să li se asigure aceleași condiții de muncă și de viață în scopul cruțării hematopoiezei sensibilizate la cele mai diverse acțiuni toxice. Educația sanitară trebuie să se adreseze atât bolnavului, cât și familiei acestuia.

Tratamentul se adresează îndeosebi formelor severe de boală. În lipsa unei etiologii precise, tratamentul este substitutiv (transfuzii de sânge sau concentrate celulare); mielostimulator (androgeni); patogenic (imunosupresie, splenectomie, transplantare de măduvă osoasă) și al complicațiilor hemoragice sau infecțioase.

Măsuri generale. Orice substanță toxică cu potențial mielodepresor va fi îndepărtată din mediul de viață al pacientului pentru a preveni extinderea leziunii medulare.

Bolnavul trebuie să mențină o *igienă bucală* bună, prin clătirea cu apă oxigenată și utilizarea unei perii de dinți moale. Sângerările orale persistente pot fi oprite prin acid epsilonaminocaproic. Menstrele pot fi suprimate cu androgeni sau contraceptive. Injecțiile intramusculare vor fi evitate sau se vor face cu un ac subțire, urmate de presiune îndelungată la locul de puncție. Aspirina va fi interzisă pentru acțiunea sa antiagregantă trombocitară. Febra va fi tratată cu acetaminofen (Paracetamol).

Bolnavul va fi instruit pentru evitarea traumatismelor, îndeosebi a celor cranio-cerebrale. În trombocitopeniile severe (sub 10 000/μl) crește pericolul de hemoragie cerebrală, din care motiv vor fi suprimate cauzele de creștere a tensiunii intracraniene (hipertensiune arterială, eforturi de vomă, tuse, menținerea unei poziții cu capul mai jos decât trunchiul, căldură excesivă).

Transfuziile se vor administra numai în situațiile în care viața bolnavului este amenințată. La bolnavii la care se are în vedere transplantul de măduvă osoasă, transfuziile vor fi amânate cât mai mult posibil, pentru efectuarea pregătirilor, iar dacă sunt imperios necesare nu vor fi folosiți ca donatori membrii de familie și cu atât mai mult donatorul histocompatibil în sistemul HLA.

Transfuziile de eritrocite devin necesare în anemiile severe și în hemoragiile acute. De fapt, nu atât valorile hemoglobinei și hematocritului decid oportunitatea transfuziei de eritrocite, ci modul în care bolnavul suportă hipoxia anemică. Se va ține seama că, la bolnavii în vârstă sau la cei cunoscuți ca purtători ai unei cardiopatii ischemice, hemoglobina nu trebuie să scadă sub 8 g, pentru a se evita accidentele coronariene sau cerebrale. Pentru diminuarea pericolului de sensibilizare, se utilizează eritrocite spălate în suspensie care conține un număr foarte scăzut de leucocite și trombocite. La bolnavii care ajung la o stabilizare a situației hematologice compatibilă cu viața, dar cu nevoia de transfuzii pentru corectarea anemiei, se va avea în vedere ca transfuziile să se facă numai pentru asigurarea unui confort clinic bolnavului și nu până la corectarea integrală a anemiei. Beneficiul imediat al transfuziei trebuie pus în balanță cu riscurile de imunizare, transmiterea de boli infecțioase (hepatită, infecția cu citomegalovirus sau HIV) și hemocromatoză.

Concentratele de granulocite nu se folosesc preventiv deoarece în numeroase cazuri nivelurile de granulocite sub 200/μl sunt compatibile cu o stare clinică bună. Numai infecțiile grave, ce nu pot fi stăpânite prin antibiotice, justifică administrarea de concentrate de granulocite. În aceste cazuri se va administra la adult o doză ridicată de granulocite ($0,5—2\times10^{10}$), preferabil de două ori pe zi. Acest ritm de administrare are în vedere *turnover*-ul rapid al granulocitelor în sânge. Eficacitatea transfuziilor de granulocite nu se apreciază după creșterea numărului de granulocite din sânge, deoarece acestea se îndreaptă spre țesuturi la foarte scurt timp după introducerea în circulație; administrarea de granulocite continuă până la rezolvarea infecției sau până la creșterea numărului de granulocite produse de pacient. În scop profilactic, transfuzia de granulocite se face doar la bolnavii cu transplant de măduvă osoasă, în perioada de aplazie totală și imunosupresie ce urmează după regimul de condiționare a prinderii grefei.

Concentratele de trombocite au o utilizare puțin diferită. În general, se menține regula după care administrarea lor se face în caz de sângerare ce amenință viața bolnavului și care nu poate fi stăpânită prin alte mijloace. Cu toate acestea, în marile trombocitopenii (sub 10 000/μl) există pericolul hemoragiei cerebrale, fatale. Deși, în experiența noastră, pacienții cu 5 000 trombocite/μl au păstrat vreme îndelungată o stare clinică satisfăcătoare, au fost observate și cazuri la care, în mod imprevizibil, a apărut hemoragia cerebrală, cu evoluție fatală în câteva ore. La adulți și vârstnici sau atunci când se mai adaugă o cauză favorizantă (vasculita prin boala autoimună sau boala serului, febră mare, vărsături), trebuie luată în considerare profilaxia accidentului hemoragic cerebral. O situație particulară este și aceea când unui bolnav trombocitopenic i se administrează cantități mari de sânge con-

servat (de exemplu, pentru o hemoragie digestivă). Numărul redus de trombocite ale bolnavului este astfel şi mai intens scăzut prin diluarea cu sângele conservat, lipsit de trombocite. Se preferă, în aceste cazuri, sângele proaspăt, sângele recoltat de la un policitemic sau administrarea unui concentrat de trombocite la câteva flacoane de sânge conservat.

Administrarea trombocitelor se face în doze de aproximativ 1×10^{11} pe zi, până la rezolvarea sindromului hemoragic sau până la depăşirea unei situaţii critice (de exemplu, o opreaţie). Izoimunizarea apare după câteva săptămâni şi poate face ineficiente tratamentele ulterioare cu trombocite. Transfuziile cu concentrate trombocitare, preparate de la un singur donator, întârzie apariţia sensibilizării (45, 77). Când bolnavul a devenit refractar la trombocitele donatorilor obişnuiţi, numai trombocitele de la persoane compatibile total sau parţial în sistemul HLA mai pot fi eficiente.

Infecţia la neutropenici reprezintă o ameninţare gravă la viaţa bolnavului. Imediat ce febra şi semnele locale sugerează infecţia, se fac culturi din sânge, urină, faringe şi din orice leziune inflamatorie suspectă. Gravitatea situaţiei impune măsuri urgente, care încep cu administrarea de antibiotice. Urgenţa instituirii tratamentului nu permite aşteptarea rezultatelor de laborator şi antibioterapia se face în mod empiric, dar cu respectarea câtorva reguli (tabelul 23. V).

TABELUL 23. V

Atributele esenţiale ale regimurilor empirice de antibioterapie
(după 69)

1. Activitate cu spectru larg (incluzând *Pseudomonas aeruginosa*)
2. Intens bactericide
3. Eficiente în absenţa neutrofilelor
4. Potenţial scăzut de instalare a rezistenţei

Asemenea indicaţii sunt întrunite în regimurile empirice de antibioticoterapie care includ un aminoglicosid (gentamicină, tobramicină sau amikacină), în combinaţie cu o penicilină „antipseudomonală" (carbenicilină sau ticarcilină) şi adesea cu un β-lactam „antistafilococic" (oxacilina sau o cefalosporină de primă generaţie). Dozele administrate trebuie să fie la nivel corespunzător, de exemplu, gentamicină 80 mg, la 8 ore, carbenicilină 5—6 g, la 6 ore, cefalosporină (Keflin, Cefatrexil), 1,5 g la 6 ore. Este recomadabil să se adauge cefalosporina numai dacă febra se menţine după câteva zile. În asocierea aminoglicosidului cu cefalosporina se va ţine seama de funcţia renală. Dacă febra cedează, tratamentul va fi continuat în acelaşi mod încă vreo câteva zile. În caz contrar, se va adapta tratamentul la datele obţinute prin antibiograme. În cazurile de mucozită orală severă, gingivită necrozantă sau infecţie perirectală se adaugă un agent antianaerobic (metronidazol sau clindamicină).

Febrele neinfluenţate de antibiotice sunt de obicei datorate infecţiilor virale sau fungice. În cazuri rare, febra produsă de ţesuturi necro-

tice sau hematoame poate răspunde la corticosteroizi. În ultimii ani, apariția cefalosporinelor din generația a III-a (Ceftazidima-Fortum, Ceftriaxona, Racephin, Cefobid) cu spectru ultralarg, a permis o monoterapie empirică a infecțiilor la neutropenici de o înaltă eficiență (69).

Izolarea parțială în cameră separată, interzicerea vizitelor, spălatul mâinilor și portul măștilor pentru personalul medical și de îngrijire sunt măsuri utile pentru prevenirea infecțiilor. Acolo unde este posibil, în neutropeniile foarte severe, se utilizează izolarea completă în camere sau celule sterile, cu flux laminar de aer steril și accesul personalului numai în echipament steril (66).

Chimioprofilaxia antiinfecțioasă se adresează în primul rând florei microbiene intestinale. Trimetoprim-Sulfametazolul (Biseptol, Septrin) este aproape unanim acceptat (67). Acesta având avantajele că este bine tolerat, reduce incidența infecțiilor enterobacteriale și previne pneumonia cu *Pneumocystis carinii.*

Tratamentul mielostimulator. Corticosteroizii au fost folosiți în anemiile aplastice ca imunosupresori sau ca mielostimulatori. Această din urmă acțiune nu este reală ci ține de faptul că după administrarea de corticosteroizi numărul de granulocite crește prin mobilizarea rezervelor medulare și prin împiedicarea ieșirii granulocitelor din vase spre țesuturi. Folosirea lor în continuare se datorește și efectului lor asupra vaselor, influențând sindromul hemoragic dat de trombocitopenie și de cel asupra ratei de distrucție eritrocitară (74). În plus, prednisonul în doze de 0,2—1 mg/kg corp se asociază la tratamentul cu androgeni pentru limitarea efectului de maturare rapidă a scheletului. Reacțiile lor adverse întrec însă de multe ori efectul scontat, iar unele studii, pe număr mare de cazuri, arată că asocierea prednisonului la tratamentul cu androgeni a agravat prognosticul (22), probabil prin creșterea riscului de infecție la pacienții granulocitopenici.

Eficacitatea androgenilor în tratamentul anemiilor aplastice este controversată. Studii mai vechi (74, 71, 22, 42) au arătat ameliorări, uneori remisiuni complete, după androgeni administrați *per os;* alte studii (15) însă nu au confirmat aceste efecte pozitive.

După experiența clinicii noastre, formele medii sau medii-severe răspund uneori la tratamentul oral cu anapolon (Oxymetholon), dar folosit în doze relativ mari (2 mg/kg corp/zi, adică 150 mg/zi, pentru un adult) și timp îndelungat (3—4 luni). De asemenea, poate fi folosit fluoximesteronul (1 mg/kg/zi) *per os.* Ameliorarea hematologică are loc, de obicei, prin refacerea eritropoiezei cu corectarea anemiei. Cam în același timp se observă și efectul asupra granulocitopoiezei. Trombocitopenia este influențată tardiv, uneori după luni de zile de la încetarea tratamentului. Lipsa de eficacitate nu poate fi afirmată decât după cel puțin 3 luni de tratament. Răspunsul poate fi durabil, dar de multe ori este incomplet (pe o serie celulară medulară, lăsând pe celelalte nemodificate, sau pe toate seriile, dar la valori subnormale, compatibil totuși cu o viață aproape de normal). De asemenea, pot apărea recidive ale bolii (71). Uneori tratamentul trebuie continuat mult timp, chiar peste un an (22).

Modul de acțiune al andrgenilor este insuficient cunoscut. A fost dovedită o stimulare directă a celulelor hematopoietice (86, 21) și o

acțiune asupra celulelor stromale medulare (43). Stimularea sintezei de Hb (59) și potențarea acțiunii eritropoietinei au fost de asemenea descrise (68). O altă explicație ar fi efectul imunosupresor al androgenilor observat pe modele experimentale animale în bolile autoimune (90). Androgenii stimulează producerea de eritrocite prin acțiune asupra precursorilor eritroizi și, în mai mică măsură, producerea de granulocite și trombocite. Pentru a fi eficienți, androgenii au nevoie de țesut eritropoietic restant asupra căruia să acționeze. Acest țesut lipsește în formele severe de aplazie medulară, dar este prezent în fomele medii. Acest tratament, care și-a dovedit utilitatea, cu limitele prezentate, are unele inconveniente serioase. Unul dintre acestea este lezarea funcțională hepatică, îndeosebi de tipul colestazei, cu inapetență, dureri, hepatomegalie, icter. Cele mai multe studii au arătat că toxicitatea hepatică este mai mare pentru compușii 17-α-alchilanți decât pentru cei nealchilanți. *Anomaliile funcționale hepatice apar în aproximativ 35%* din cazuri (22). În afectările hepatice ușoare, tratamentul nu trebuie întrerupt, dar în cazurile cu tulburări mai severe fie se reduce temporar doza, fie se întrerupe pentru câteva zile tratamentul. Reluarea tratamentului este bine suportată în cele mai multe din cazuri.

Mai puțin frecventă, dar de mai mare severitate, este hepatotoxicitatea ce se manifestă ca adenoame hepatice sau carcinoame hepatocelulare. Acestea sunt mai frecvente la pacienții care au primit compuși 17-α-alchilanți și la pacienți cu aplazie Fanconi. Tumorile hepatice pot regresa complet după întreruperea tratamentului. Bolnavii care primesc androgeni pe timp îndelungat (uneori ani de zile) trebuie controlați cu scintigrame sau ecografii hepatice la 4—6 luni.

Alte reacții adverse ale terapiei cu androgeni sunt virilizarea, acneea feței și toracelui, încetinirea creșterii copilului prin osificarea prematură a zonelor de creștere. Adăugarea corticosteroizilor, în doze medii ar diminua acest efect nedorit al androgenilor asupra creșterii.

Imunosupresia s-a impus în terapia anemiilor aplastice în urma dovezilor în favoarea mecanismului patogenic imun. Cu toate acestea nu există o modalitate de selecție a pacienților pentru acest tip de tratament.

Ciclofosfamida a fost introdusă în tratamentul anemiei aplastice severe în urma observațiilor de refacere autologă a hematopoiezei după condiționarea pacientului cu doze mari din acest citostatic pentru transplantare, fără prinderea grefei alogene. Rezultatele bune au fost înregistrate numai în aplazia eritrocitară. În anemia aplastică globală, tratamentul cu ciclofosfamidă, neurmat de transplantare de măduvă, a dus la numai patru remisiuni din 71 de bolnavi (36). *Metilprednisolonul* în doze mari a fost administrat intravenos după următoarea schemă (8); 20 mg/kg corp/zi, zilele 1—3; 10 mg/kg corp/zi, zilele 4—7; 5 mg/kg corp/zi, zilele 8—11; 2 mg/kg corp/zi, zilele 12—20 și 1 mg/kg corp/zi, până în ziua a 30-a. Pentru menținere, au fost folosite doze de 0,1—0,2 mg/kg corp/zi, *per os*. Din 24 de bolnavi tratați, 8 (30%) au avut un răspuns complet. Singurul factor ce a putut fi pus în legătură cu remisiunea completă a fost timpul de diagnostic. Refacerea completă a hematopoiezei a fost obținută numai la bolnavii tratați în primele 4 săptămâni de la diagnostic (8).

Serul antilimfocitar sau, mai precis, globulina antitimocitară (GAT) este tratamentul cel mai des folosit. Acesta este un ser heterolog, obținut prin imunizarea animalelor cu limfocite umane din timus sau canalul toracic. Procedeul terapeutic este relativ simplu: GAT se administrează intravenos, în perfuzie de 4—6 ore, 20—40 mg/kg, timp de 8 zile. Boala serului apare aproape invariabil, după circa 10 zile de la începerea tratamentului, cu febră, frisoane, eritem, artralgii. Pentru prevenirea sau cel puțin atenuarea acestor complicații se administrează prednison 1 mg/kg/zi, în primele 14 zile. Această corecție este absolut necesară deoarece exacerbarea permeabilității capilare la un pacient trombocitopenic este urmată de hemoragia cerebrală fatală.

Rezultatele sunt pozitive, la 50% din pacienți obținându-se remisiunea anemiei aplastice în decurs de 3 luni după tratament (57, 78, 26, 18, 17). Refacerea hematologică poate să nu fie completă, în multe cazuri persistând o trombocitopenie moderată. În unele cazuri boala recidivează (81) și la 10% din pacienți se poate dezvolta hemoglobinurie paroxistică nocturnă sau dismielopoieză și leucemie acută.

Cele mai bune rezultate se obțin în aplazia eritroidă pură (55). Asocierea GAT cu androgeni a dus la o rată a supraviețuirii de 65% la 3 ani (4, 27).

În ultimul timp, se practică imunosupresia cu *Ciclosporina A*. Acțiunea sa asupra limfocitelor T îi justifică utilizarea în anemiile aplastice. Preparatul Sandimmun este bine tolerat *per os* sau i.v., nu prezintă dezavantajele serului heterolog ca în cazul GAT, dar este scump și poate duce la insuficiență renală, reversibilă, hipertensiune arterială, crize epileptice și favorizează infecții oportunistice. Preparatul oral se administrează în doze de 5—8 mg/kg/zi, în două prize. Semnele de refacere hematologică apar după primele săptămâni, rezultatele fiind comparabile cu ale GAT.

Pe un lot de 334 pacienți din mai multe țări europene, tratamentul cu ciclosporină A a avut un răspuns bun la 32% din cazurile cu formă foarte severă de anemie aplastică, la 43% din cazurile cu formă severă și la 64% din cazurile mai puțin severe (80 a). Asocierea ciclosporinei A cu GAT nu a dat rezultate superioare (33 a). În schimb, adăugarea la tratamentul cu ciclosporină A a oximetholonului a crescut rata răspunsului de la 40% la 56%, îndeosebi la femei cu număr redus de neutrofile. Incidența bolilor clonale (HPN, mielodisplazii) a fost mai mare la cazurile tratate cu ciclosporină A sau GAT decât la cele supuse tratamentului cu androgeni sau transplantare de măduvă osoasă, în timp ce incidența tumorilor solide a fost similară în ambele grupe (77 a).

Splenectomia a fost recomandată ca mijloc de a ameliora funcționarea măduvei în anemiile aplastice (50). Literatura citează câteva cazuri rezolvate cu succes, dar se admite că adesea intervenția nu este urmată de remisiuni hematopoietice (29). În aplazia eritroidă pură, doar 14% din pacienți au răspuns la splenectomie (20), nejustificând riscurile operației și incidența crescută a infecțiilor tardive de mare gravitate.

Datele Clinicii de hematologie București sunt mai încurajatoare: din 25 de splenectomii practicate pentru anemiile aplastice globale după stabilizarea stării clinice, 5 au avut remisiune completă hematologică, iar 7 cazuri o ameliorare clinică și hematologică. În alte 6 cazuri, deși

valorile hematologice nu au fost modificate, s-a observat o ameliorare clinică, îndeosebi a sindromului hemoragic. În nici un caz, starea pacientului nu s-a agravat ca urmare a splenectomiei. Nu au existat decese legate direct de intervenţia chirurgicală.

Nu există o explicaţie satisfăcătoare pentru modul de acţiune a splenectomiei în anemiile aplastice. S-ar putea ca splina să fie rezervorul principal al limfocitelor medulosupresive; în plus, splenectomia poate creşte durata de viaţă a eritrocitelor circulante, în mod deosebit la pacienţii la care hemosideroza transfuzională sau complicaţiile inflamatorii au produs splenomegalie şi hipersechestrare. Splenectomia în anemiile aplastice nu poate fi practicată decât în centrele care au la dispoziţie concentrate de trombocite şi o echipă capabilă să facă faţă complicaţiilor hemoragice şi infecţioase postoperatorii.

Limfocitofereza (7 proceduri în decurs de 9 săptămâni) realizată cu separator de celule IBM, a dus la o remisiune de lungă durată a unui caz de aplazie severă (46).

Factorii hematopoietici de creştere au fost utilizaţi în tratamentul aplaziilor medulare în intenţia de a stimula dezvoltarea unui ţesut hematopoietic grav afectat de cauze multiple. Factorul stimulator al coloniilor granulomonocitare (FSC—GM), factorul stimulator al coloniilor granulocitare (FSC—G) şi interleukina-3 sau factorul stimulator al coloniilor mixte (FSC—GEMM) sunt în curs de experimentare clinică. Rezultatele de până acum nu sunt prea încurajatoare. Este posibil că folosirea acestor stimulatori în combinaţie cu alte mijloace terapeutice — imunosupresia, de exemplu — va duce la rezultate mai bune.

Transplantarea de măduvă osoasă se practică atunci când au fost epuizate alte mijloace terapeutice sau când de la început se întrevede o lipsă de răspuns la terapia convenţională. În esenţă, este vorba de a transplanta celule stem normale unei gazde care şi-a epuizat propriile celule stem hematopoietice.

Transplantarea de măduvă osoasă parcurge mai multe etape:

1) Stabilirea indicaţiei de transplantare pentru pacienţii cu formă severă de anemie aplastică, convinşi să accepte procedura după ce au fost informaţi despre riscurile inerente acesteia, şi care au un donator compatibil.

2) Selecţia donatorului este determinată de compatibilitatea în complexul major de histocompatibilitate (sistemul HLA) (v. cap. respectiv).

3) Pregătirea bolnavului pentru acceptarea celulelor transplantate este necesară, chiar dacă este asigurată histocompatibilitatea HLA. În afara antigenelor din acest sistem există multe alte antigene, de histocompatibilitate minoră, ce nu pot fi testate, dar care contribuie la dezvoltarea reacţiei de respingere a transplantului. Imunosupresia bolnavului se face cu ciclofosfamidă 50 mg/kg corp/zi, 4 zile, la care se mai pot adăuga procarbazină, globulină antilimfocitară sau iradiere a sistemului limfoid. Bolnavul este izolat în camere sterile şi se începe hrănirea parenterală.

4) Aspirarea măduvei osoase de la donator prin puncţii multiple, sub anestezie generală, în volum de 500—800 ml.

5) Perfuzia suspensiei de celule medulare pe cale intravenoasă. Pentru asigurarea prinderii transplantului este necesar un număr de celule nucleate medulare de $2—6 \times 10^8$/kg corp.

6) Tratamentul intensiv al bolnavului în perioada dintre tratamentul imunosupresiv, care în același timp induce o ablație a măduvei subiectului, și momentul începerii funcționării celulelor transplantate; în decurs de 2—4 săptămâni sunt necesare concentrate celulare, tratamentul infecțiilor, hemoragiilor, alimentație parenterală.

7) Prinderea și funcționarea transplantului este dovedită de apariția și creșterea numărului de celule sanguine, cu caracteristici ale donatorului.

După prinderea transplantului pot apărea complicații ca: a) rejecția grefei; b) infecții severe cu germeni Gram-negativi și infecții oportunistice virale, fungice sau cu protozoare; c) boala acută sau cronică de grefă—contra—gazdă.

Rezultatele transplantării de măduvă osoasă în anemiile aplastice au fost modeste (supraviețuire de 40—45%) în perioada 1972—1976 (79). Recunoscându-se rolul izoimunizării prin transfuzii, transplantarea pacienților înaintea începerii transfuziilor a ridicat numărul supraviețuitorilor de sub 20 de ani, la 70—80% (13, 33).

Bolnavul și familia trebuie informați despre valoarea relativă a transplantării de măduvă osoasă care poate adesea vindeca boala, dar cu prețul unei morbidități iatrogenice importante și a unui cost foarte ridicat, cât și despre valoarea terapiei imunosupresoare, mai ușor de efectuat, dar incomplet eficace.

În final, cu privire la tratamentul anemiilor aplastice cu GAT sau transplantarea de măduvă osoasă, este oportun să se prezinte planul de acțiune pentru fiecare caz nou, elaborat de unul dintre grupurile cu cea mai mare experiență (81). Dacă pacientul are un geamăn identic normal, transpalntarea de măduvă izogeneică trebuie făcută imediat, indiferent de vârstă. Lipsa de răspuns în 3—4 săptămâni determină o a doua transplantare, dar după un regim imunosupresiv. Dacă pacientul este un candidat potențial pentru transplantarea alogenică, nu se vor face transfuzii cu produse de sânge și îndeosebi nu vor fi folosiți ca donatori de sânge membrii familiei. Pentru pacienții sub vârsta de 40 de ani, transplantarea de la un frate identic în sistemul HLA este tratamentul de elecție. De aceea va fi întreprinsă prompt tipizarea HLA a întregii familii și dacă pacientul are un donator identic HLA, transplantarea va fi făcută cât mai repede posibil, de preferat înainte de a i se face transfuzii. Dacă pacientul nu are frate compatibil în sistemul HLA, se va administra globulină antilimfocitară. În lipsa unui răspuns la acest din urmă tratament, se caută un donator identic HLA în restul familiei sau în afara ei. Pentru pacienții în vârstă de 40—50 ani, din cauza severității bolii de grefă—contra—gazdă (a cărei frecvență ajunge până la 90% la adulți peste 30 de ani) pe care o dezvoltă după transplantare de măduvă, aceasta se va face numai în caz de nereușită a tratamentului cu globulină antitimocitară. După vârsta de 50 de ani nu se mai face transplantare de măduvă și pacienții vor fi tratați cu globulină antitimocitară sau ciclosporină A (81). Lucrări mai recente, pe pacienți tratați în Europa între 1981 și 1986, arată un răspuns egal (60%) prin ambele

procedee terapeutice, cu specificarea că transplantarea de măduvă este superioară ca efect la vârste sub 20 de ani și GAT la cele peste 20 de ani (9). În circa 5—10% din cazuri pot apărea recidive pancitopenice severe sau mielodisplazii, HPN ori leucemii acute. Trebuie remarcat că, deși GAT și ciclosporina A dau rezultate mai instabile (recidive, persistența unui grad de citopenie), este totuși un mijloc terapeutic mai puțin riscant și mai ieftin.

BIBLIOGRAFIE

1. AHN Y. S. și colab.: Ann. Int. Med. 1985; 102: 298.
2. ALTER B. P.: Exp. Hematol. 1979; 7: 200.
3. ALTER B. P.: Am. J. Pediat. Hematol. Oncol. 1980; 2: 121.
4. APPELBAUM F. R., FEFER A.: Sem. Hematol. 1981; 18: 241.
5. APPELBAUM F. R. și colab.: Exp. Hematol. 1987; 15: 1134.
6. APPELBAUM F. R. și colab.: Blood 1987; 69: 92.
7. ASTER R. H.: În Hematology. Mc.Graw-Hill Book Comp., New York, 1983.
8. BACIGALUPO A. și colab.: J. Immunol. 1980; 125: 1449.
9. BACIGALUPO A. și colab.: Br. J. Haematol, 1988, 70: 177.
10. BARRET A. J. și colab.: J. Clin. Pathol. 1979; 32: 660.
10a. BESIEN K. și colab.: Eur. J. Haematol. 1991; 47: 253.
11. BEUTLER E., ARSLEV A. J., LICHTMAN M. A.: Hematology, Edit. Mc.Graw-Hill, New York, 1983.
12. BOGGS D. R., BOGGS S. S.: Blood 1976; 48: 71.
13. BORTIN M. M. și colab.: J. Am. Med. Assoc. 1981; 245: 1132.
14. CAMITTA B. M., THOMAS E. D.: Clin. Haematol. 1978; 32: 88.
15. CAMITTA B. M. și colab.: Blood 1979; 53: 504.
16. CAMITTA B. M. și colab.: New Engl. J. Med. 1982; 306: 645.
17. CAMITTA B. M. și colab.: Blood 1983; 62: 883.
18. CHAMPLIN R. și colab.: New Engl. J. Med. 1983; 308: 113.
19. CHIN K. M., KNOSPE W. H.: Exp. Hematol. 1987; 15: 269.
20. CLARK D. A. și colab.: Blood 1984; 63: 277.
21. CLAUSTRES M. și colab.: Eur. J. Pediat. 1986; 144: 467.
22. * * * — Cooperative Group For Study of Aplastic and Refractory Anemias: Scand. J. Haematol. 1979; 22: 343.
23. CUNNINGHAM J. L. și colab.: Br. Med. J. 1974; 3: 313.
24. DE PLANQUE M. M. și colab.: Br. J. Hematol. 1988; 70: 55.
25. DESSYPRIS E. N. și colab.: New Engl. J. Med. 1983; 309: 690.
26. DONEY K. și colab.: Blood 1984; 63: 342.
27. DONEY K. și colab.: Exp. Haematol. 1987; 15: 239.
28. DONEY K. și colab.: Br. J. Haematol. 1988; 68: 469.
29. ERSLEV A. J.: În: Hematology, Mc.Graw-Hill Book. Comp., New York, 1983, 151.
30. FICHTEN J. H., CLINE M. J.: Br. J. Haematol. 1980; 44: 7.
31. GASCON P., SCALA G.: Am. J. Med. 1988; 85: 668.
32. GEWIRTZ A. M. și colab.: Blood 1986; 68: 619.
33. GLUCKMAN E.: Exp. Hematol. 1982; (suppl. 10): 14.
33a. GLUCKMAN E. și colab.: Blood 1992; 79: 2540.
34. GOLDSTEIN J. M., COLLER B. S.: Ann. Intern. Med. 1975; 82: 537.
35. GRIGORIU G., BERCEANU ȘT.: În Șuțeanu Șt. (ed.): Actualități în medicina internă. Edit. Medicală, București, 1985, 450.
36. GRINER P. F.: Am. J. Hematol. 1980; 8: 55.
37. HAAS O. A. și colab.: Am. J. Hematol. 1988; 27: 20.
38. HAGLER L.: Medicine (Baltimore) 1975; 54: 139.
39. HATHAWAY W. E. și colab.: J.A.M.A. 1967; 201: 1015.
40. HEIMPEL H., HEIT W.: Clin. Haematol. 1980; 9: 641.
41. HELLMAN S. și colab.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1978; 74: 490.
42. HENGSTURN VAN M. și colab.: Br. J. Haematol. 1979; 41: 323.
43. HICKEY D., McCANN S. R.: Bone Marrow Transpl. 1987; (suppl. 1) 2: 106.
44. HOFFMAN A. și colab.: Blood 1978; 52: 255.

45. HUART J. J. şi colab.: Rev. Fr. Hématol. 1983; 25: 229.
46. ITO T. şi colab.: Acta Haematol. 1988; 80: 167.
47. HANSEN J. şi colab.: Exp. Hematol. 1982; (suppl. 12): 132.
48. JEPSON J. H., LOWENSTEIN L.: Blood 1964; 24: 726.
49. KALTWASSER J. P. şi colab.: Eur. J. Haematol. 1988; 40: 111.
49a. KAPLAN P. P.: Radiology 1987; 164: 441.
50. KOCH J. L.: Arch. Intern. Med. 1967; 119: 305.
51. KOEPPLER H., GOLDMAN J. M.: Eur. J. Haematol. 1988; 41: 182.
52. LAZARUS K. H., BACHNER E. L.: Pediatrics 1981; 67: 907.
53. LOHRMAN H. P.: Blut 1979; 39: 237.
54. LUM L. G. şi colab.: Am. J. Haematol. 1987; 26: 1.
55. MANGAN K. F., SHADDUCK R. K.: Am. J. Hematol. 1984; 17: 417.
56. MARINONE G. şi colab.: Haematologica 1981; 66: 796.
57. MATHÉ G., SCHWARZENBERG L.: Exp. Hematol. 1976; 4: 256.
58. McVERRY B. A. şi colab.: Br. J. Haematol. 1985; 61: 145.
59. MIZOGUCHI H., LEVERE R.: J. Exp. Med. 1971; 134: 1501.
60. MORLEY A. şi colab.: Br. J. Haematol. 1976; 32: 525.
61. NAGASAWA T. şi colab.: Blood 1981; 58: 1025.
62. NARA N. şi colab.: Exp. Haematol. 1982; 10: 20.
63. NISSEN C. şi colab.: Br. J. Haematol. 1980; 45: 233.
64. NISSEN C. şi colab.: Br. J. Haematol. 1986; 64: 355.
65. NISSEN C. şi colab.: Br. J. Haematol. 1988; 69: 405.
65a. NISSEN C.: Acta Haemat. 1991; 86: 57.
65b. PANTEL K. şi colab.: Blood 1991; 78: 1428.
66. PIZZO P. A.: Am. J. Med. 1981; 70: 631.
67. POW E. J. şi colab.: Am. J. Med. 1984; 76: 223.
68. RISHPON-MEYERSTEIN N. şi colab.: Blood 1968; 31: 453.
69. RUBIN M. şi colab.: Cancer Invest. 1988; 6: 167.
70. SAMSON J. P. şi colab. Acta Haematol. 1972; 48: 218.
71. SANCHEZ-MEDAL L. şi colab.: Blood 1969; 34: 283.
72. SCHOOLEY J. C. şi colab.: Br. J. Haematol. 1987; 67: 11.
73. SCHULTZ D. R. şi colab.: Clin. Res. 1979; 27: 464.
74. SHAHIDI N. T., DIAMOND L. K.: New Engl. J. Med. 1961; 264 P 953.
75. SILVER B. J., ZUCKERMAN K. S.: Med. Clin. North Am. 1980; 64: 607.
76. SINGER J. W., BROWN J. E.: Clin. Haematol. 1978; 7: 487.
77. SINTNICOLAAS K. şi colab.: Lancet 1981; 1: 750.
77a. SOCIÉ G. şi colab.: New Engl. J. Med. 1993; 39: 1152.
78. SPECK B. şi colab.: Lancet 1977; 2: 1145.
79. STORB R. şi colab.: Blood 1976; 48: 817.
80. SULLIVAN R. şi colab.: Blood 1980; 56: 625.
80a. SCHREZENMEIER H. şi colab.: Ann. Haematol. 1992; 35: 33.
81. THOMAS E. D., STORB R.: Blood 1984; 64: 525.
82. TICHELLI A. şi colab.: Blood 1988; 56: 79.
83. TOROK-STORB B. şi colab.: Blood 1980; 55: 211.
84. TOROK-STORB B. şi colab.: Blood 1984; 63: 349.
85. TOROK-STORB B.: În: Progress in bone morrow transplantation, Edit. Alan R. Liss, New York, 1987, 13.
86. URABE A. şi colab.: J. Exp. Med. 1979; 149: 1314.
87. VINCENT P. C.: Blut 1984; 49: 3.
88. WANG W. C. şi colab.: Am. J. Med. Sci. 1986; 2: 304.
89. WARREN R. P. şi colab.: Blood 1980; 56: 633.
90. WEINSTEIN Y., BERKOVICK Z.: J. Immunol. 1981; 126: 998.
90a. YOUNG N.: Semin. Haematol. 1988; 25: 159.
91. YUNIS A. A., ADAMSON J. W.: Am. J. Haematol. 1977; 2: 335.
92. YUNIS A. A. şi colab.: Clin. Toxicol. 1980; 17: 359.
93. ZOUMBOS N. C. şi colab.: Br. J. Haematol. 1984; 58: 95.

XXIV

ANEMIILE DISERITROPOIETICE CONGENITALE

ADRIANA COLIȚĂ

Definiție, delimitare, istoric. Anemiile diseritropoietice congenitale (ADC) reprezintă un grup rar de anemii ereditare care se caracterizează prin eritropoieză ineficientă, multinuclearitatea eritroblaștilor, hemocromatoză secundară și rezistența la tratament (1, 12).

Eritropoieza ineficace, termen de kinetică, evidențiază activitatea eritroidă crescută a măduvei, dar cu distrucție intramedulară a eritroblaștilor și eliberarea unei cantități scăzute de eritrocite în circulație (12). Acest aspect al eritropoiezei a fost demonstrat în ADC prin: turnover-ul crescut al fierului plasmatic, încorporarea scăzută a fierului marcat în eritrocitele circulante, creșterea stercobilinogenului fecal, creșterea producției endogene de oxid de carbon derivat din catabolismul hemului, hiperplazie eritroidă intensă, dar cu număr normal sau ușor crescut de reticulocite.

Diseritropoieza (termen utilizat pentru modificările calitative ale eritropoiezei) se caracterizează prin: a) anomalii morfologice ale eritroblaștilor din măduva osoasă (multinuclearitate, kariorexie, megaloblastoză, punți internucleare); b) anomalii izotopice caracteristice pentru eritropoieză inefectivă; c) anomalii ale membranei eritrocitare (modificări ale aranjamentului antigenic, reacții serologice neobișnuite, creșterea unor enzime eritrocitare) (13).

Caracteristic pentru ADC este apariția anemiei din copilărie. Frecvent pacienții au icter cu bilirubina indirectă crescută și splenomegalie. Durata de viață a eritrocitelor este normală sau ușor scurtată. Diseritropoieza cu componentă crescută de distrucție intramedulară a eritroblaștilor este factorul determinant în patogenia anemiei în ADC. Hemocromatoza este urmarea eritropoiezei ineficace și a absorbției intestinale crescute de fier.

În 1951, Wolff și Hofe (1) au descris primul caz de anemie familială, caracterizat prin prezența de eritroblaști multinucleați în măduva osoasă și eritropoieză ineficace.

În 1968, Heimpel și Weudt (7), pe baza modificărilor morfologice a eritroblaștilor la microscopul optic și a anomaliilor serologice care duc la liza eritrocitelor *in vitro*, au diferențiat *trei tipuri de ADC* (tabelul 24.I).

Tipul I, caracterizat prin prezența de eritroblaști megaloblastoizi și punți cromatiniene internucleare.

Tipul II, caracterizat prin prezența de eritroblaști bi- și multinucleați și testul lizei cu ser acidifiat (Ham) pozitiv.

Tipul III, caracterizat prin prezența de eritroblaști multinucleați („gigantoblaști").

TABELUL 24.I

Anemia diseritropoietică congenitală

Caracteristici	Tip I	Tip II (HEMPAS)	Tip III
Mod de transmitere	AR	AR	AD
Anemia	Ușoară	Moderată→severă	Ușoară
Eritrocite sânge	Macrocite	Normocite	Macrocite
Eritroblaști din măduva osoasă	Afectați Pro Eb și Eb bazofili	Afectați Eb poli- și oxifili	Gigantoblaști (∅>50μ; >12 nuclei)
a) Microscopie optică	Megaloblastoizi Nuclei incomplet segmentați Nuclei dubli Punți cromatiniene internucleare	Binucleați Multinucleați	
b) Microscopie electronică	Pori nucleari lărgiți Invaginarea citoplasmei în nucleu dând aspectul de nucleu „spongios"	Reticul endoplasmic în exces care dă aspectul de dublă membrană nucleară	Fisuri și fragmentări în regiunea nucleului Arii de autoliză în citoplasmă Mitocondrii pline cu fier Figuri mielinice
Aspect serologic Testul lizei acide	Negativ	Pozitiv cu 30% din seruri normale acidifiate	Negativ
Testul apă zahăr	Negativ	Negativ	Negativ
Aglutinare anti i	Negativ	Pozitiv	Pozitiv
Aglutinare anti I	Negativ	Pozitiv	Pozitiv

Legendă: AR=autosomal recesiv; AD=autosomal dominant; Eb=eritroblaști.

În 1969, Crookston (2) a propus denumirea de *„hereditary erythroblastic multinuclearity with a positive acidified — serum test"* (HEMPAS) pentru ADC tip II.

S-au descris ulterior variante de ADC tip II cu test Ham negativ (tipul IV al lui Mc Bride și colab., 1971) (14) și variante cu comportament serologic tipic, dar fără anomalii morfologice caracteristice (9, 18, 20).

În 1994 s-a descris o nouă formă de anemie congenitală diseritropoietică, caracterizată prin incluzii membranoase intraeritroblastice și intraeritrocitare, deficit de exprimare a glicoproteinei CD44 și un fenotip particular de grup sanguin [In (a— b—), Co (a— b—)] (15).

ANEMIA DISERITROPOIETICĂ CONGENITALĂ TIP I

ADC tip I este o formă rară de anemie. Au fost comunicate 23 de cazuri în 20 de familii (21). Modul de transmitere este autosomal recesiv. Primele manifestări ale bolii apar în copilărie sau adolescență.

Tabloul clinic este dominat de suferințe legate de anemie, icter, splenomegalie, suferință colecistică. Anemia este moderată. Pe frotiul de sânge se constată anizocitoză marcată a eritrocitelor cu macrocitoză și poikilocitoză. Uneori se evidențiază inele Cabot. La examenul măduvei osoase se remarcă anomalii morfologice marcate ale proeritroblaștilor și eritroblaștilor bazofili, care prezintă aspect „megaloblastoid". Eritroblaștii au cromatina nucleară în blocuri mari, distribuită neregulat și separată de arii translucide inegale. Unii eritroblaști au cromatina ștearsă, iar nucleul nu este net delimitat de citoplasma din jur. Trei modificări sunt considerate tipice: 1) eritroblaști de dimensiuni mari cu nucleu neregulat cu doi segmenți sugerând diviziune nucleară incompletă; 2) celule binucleate cu nuclei care diferă în mărime, structură și colorabilitate; 3) perechi de eritroblaști legați prin punți cromatiniene de diferite lungimi (8).

La microscopia electronică s-a constatat o lărgire a porilor membranei nucleare, invaginarea citoplasmei în nucleu, condensări și dezintegrări ale cromatinei nucleare. Nucleul celulelor afectate are aspect de „burete" datorită citoplasmei care separă fragmentele de cromatină. În citoplasmă s-au descris persistența de microtubuli și depozitarea de micelii feruginoase în mitocondrii (13).

În ADC tip I s-au demonstrat, într-un procent crescut de eritroblaști, valori hipertetraploide de ADN, reduceri ale sintezei de ARN cu tulburarea sintezei de hemoglobină și un dezechilibru între sinteza lanțurilor α și non α de globină (22).

Nu s-au comunicat anomalii serologice ale eritrocitelor în acest tip de ADC.

ANEMIA DISERITROPOIETICĂ CONGENITALĂ TIP II

Tipul II sau HEMPAS este varianta cea mai frecvent întâlnită de ADC și cea mai complet studiată. S-au înregistrat până în prezent peste 84 de cazuri din 55 de familii (1, 21). Boala a fost descrisă în țări din nord-vestul Europei, Italia, Africa de Nord.

Primele cazuri au fost diagnosticate în România în 1972 și publicate în 1976 (3, 4). Între 1972 și 1994 au fost înregistrate în Clinica de hematologie București 12 cazuri din 10 familii (5).

Tulburarea de bază in HEMPAS este *deficiența genetică de N-acetil-glucosaminil transferază II*, enzimă necesară pentru glicosilarea proteinelor de membrană cu lactosaminoglicani (10, 11). Spre deosebire de eritrocitele normale a căror proteine de membrană (banda 3, 4, 5 și glicoforina A) conțin lactosaminoglicani, proteinele de membrană ale eritrocitelor în HEMPAS sunt parțial glicosilate. Polilactosaminoglicanii se acumulează ca glicolipide. Eritrocitele în HEMPAS conțin un oligozaharid scurt în locul unei structuri cu greutate moleculară mare. Banda 3 de glicoproteină anormală este hidrofobă și tinde să se agrege. Acest fenomen este răspunzător de structura modificată a membranei eritrocitare în HEMPAS. Defectul de glicosilare al proteinelor de membrană este asociat cu acumularea secundară de glicolipide. Antigenul HEMPAS exprimat pe suprafața celulei este format din glicolipide anormale (23).

Boala afectează ambele sexe. Modul de transmitere este autosomal recesiv. Principalele semne clinice sunt paloarea, icterul, hepatosplenomegalia. Anemia este obișnuit mai marcată decât în ADC tip I. La 25% din pacienți boala evoluează cu anemie severă din copilărie și necesită transfuzii repetate cu masă eritrocitară. Bolnavii cu anemie severă prezintă anomalii faciale ca urmare a modificărilor oaselor craniului. Litiaza biliară apare ca o complicație tardivă și este consecința hiperbilirubinemiei. Unii pacienți prezintă semne de hemocromatoză: pigmentarea pielii, diabet zaharat, hipogonadism. Hemocromatoza apare și la bolnavi cu HEMPAS netransfuzați și este urmarea eritropoiezei ineficace și a absorbției intestinale crescute de fier.

Anemia este obișnuit moderată. 60% din pacienți au Hb sub 11 g/100 ml. Eritrocitele prezintă moderată anizocitoză, poikilocitoză și hipocromie. Uneori pe frotiul de sânge se găsesc eritroblaști binucleați. Numărul de eritrocite este normal sau scăzut în contrast cu hiperplazia eritroidă din măduvă.

Bilirubina indirectă și excreția de strecobilinogen fecal sunt crescute. Sideremia este normală sau crescută, cu coeficientul de saturație al transferinei crescut.

Studiile de ferokinetică (cu Fe^{59}) au demonstrat un *clearance* rapid al izotopului din plasmă, dar cu o încorporare redusă a Fe^{59} în eritrocite. Durata de viață a eritrocitelor este normală sau ușor scurtată.

Măduva osoasă prezintă o hiperplazie marcată a seriei eritrocitare care este normoblastică. 10—30% din eritroblaștii policromatofili sau oxifili sunt bi- sau multinucleați.

În unele cazuri s-au descris prezența de macrofage care fagocitează eritroblaștii, celule „Gaucher-*like*“ sau „histiocite cu granulații albastre ca marea“.

Hemosiderina în macrofagele medulare este crescută. Sideroblaștii sunt crescuți procentual și prezintă granule mari și numeroase de fier. Eritroblaștii bi- sau multinucleați sunt PAS-negativi.

La microscopia electronică, 90% din eritroblaști prezintă structuri membranoase formate din reticul endoplasmic situate paralel cu mem-

brana celulară. Dubla membrană celulară se găsește și la un procent mic (1%) din eritrocitele circulante, dacă sunt examinate în microscopie electronică.

Sinteza de ADN în celulele binucleate și multinucleate este absentă sau marcat redusă.

Studiul autoradiografic al celulelor medulare cu timidină H3 arată lipsa de marcare a eritroblaștilor bi- și multinucleați.

O caracteristică a HEMPAS este un comportament serologic special. Eritrocitele din HEMPAS amintesc pe cele din hemoglobinuria paroxistică nocturnă (HPN), prin susceptibilitatea la hemoliză cu unele seruri normale acidifiate. Eritrocitele din HEMPAS diferă de cele din HPN prin testul de hemoliză cu sucroză negativ și prin absența hemolizei în serul propriu acidifiat. Numai 30% din serurile normale acidifiate compatibile ca grup sanguin produc liza eritrocitelor din HEMPAS. Eritrocitele din HEMPAS, spre deosebire de cele din HPN, se comportă ca o singură populație în testele de liză.

Mecanismele responsabile de hemoliza în ser acidifiat diferă fundamental în cele două boli. În HEMPAS, hemoliza eritrocitelor în ser acidifiat este legată de apariția naturală a unui anticorp IgM care leagă complementul. Acest anticorp poate fi îndepărtat prin absorbția cu eritrocite HEMPAS, dar nu și cu eritrocite din HPN. Acest anticorp (prezent în plasmă la 30% din subiecții normali) recunoaște un determinant antigenic care apare ca o consecință a glicosilării anormale a proteinelor de membrană.

Recent s-a demonstrat în HEMPAS o reglare anormală a convertazei C_3 a căii alternante a complementului și a complexului citolitic de atac al membranei (16). Spre deosebire de HPN, reglarea aberantă a activării complementului în HEMPAS nu este consecința deficitului funcțional sau cantitativ al DAF *(decary accelerating factor)* sau MIRL *(membrane inhibitor of reactive lysis),* ci este urmarea defectului de glicosilare a glicoforinei A. Pe lângă DAF și MIRL și glicoforina A joacă rol de proteină reglatoare a activării complementului pe membrana eritrocitelor.

O altă anomalie a suprafeței eritrocitelor HEMPAS este o concentrație crescută de antigen „i" (antigen exprimat normal numai pe eritrocitele fetale). Eritrocitele din HEMPAS sunt aglutinate și lizate de seruri anti „I" și anti „i".

În HEMPAS s-a găsit o creștere marcată a activității unor enzime eritrocitare (glucozofosfat izomerază, triozofosfat izomerază, glioxalază I, fosforil-fosforibozil transferază) (1). Tiparul activității enzimelor eritrocitare în HEMPAS diferă de cel al eritrocitelor normale sau al sângelui bogat în reticulocite și amintește modificările descrise în boli caracterizate prin eritropoieză ineficace incluzând anemiile sideroblastice congenitale sau câștigate și stările preleucemice (1).

În cazurile de HEMPAS studiate de noi s-a observat o scădere a indicelui fosfatazei alcaline leucocitare (3). Acest rezultat sugerează că tulburarea de bază nu se limitează la seria eritrocitară, ci cuprinde probabil și celelalte serii medulare (anomalie de celulă stem multipotentă?).

ANEMIA DISERITROPOIETICĂ CONGENITALĂ TIP III

Prima observație de ADC tip III a fost a unei femei și a celor trei copii ai ei care prezentau anemie ușoară cu o măduvă cu eritroblaști multinucleați. Până în prezent sunt descrise 30 de cazuri din 4 familii (17, 21). Transmiterea este autosomală dominantă.

Boala evoluează obișnuit asimptomatic. Anemia este ușoară. Pe frotiu se constată prezența de eritrocite gigante.

La examenul măduvei osoase se evidențiază hiperplazia seriei eritrocitare cu prezența a ~30% precursori eritrocitari multinucleați (cu >12 nuclei). Acești eritroblaști de talie mare (cu ∅>50—60 μ) au fost numiți „gigantoblaști".

Studiile de microscopie electronică au evidențiat fisuri și fragmentări în aria nucleară, zone de liză ale citoplasmei, mitocondrii pline cu fier și figuri mielinice. Aspectul amintește tipul I de ADC, de care diferă prin absența aspectului spongios al nucleului și absența organitelor citoplasmatice în nucleu (1).

Studiile de citochimie au demonstrat o mare variabilitate a cantității de ADN în nucleul de eritroblast (6).

În eritroblaștii anormali s-au evidențiat precipitate de lanțuri β.

Studiile pe culturi de celule au demonstrat că defectul este al celulei stem eritroide. Culturile derivate dintr-un singur progenitor conțin celule normale sau aparent normale amestecate cu celule anormale morfologic (19).

Eritrocitele din ADC tip III sunt aglutinate de serurile anti „i" și anti „I", dar nu sunt lizate în ser acidifiat.

Un studiu efectuat în 1994 în Suedia pe cea mai mare familie cu ADC tip III cuprinzând 20 de bolnavi a relevat o incidență crescută (20%) de gamapatii monoclonale (mielom multiplu și gamapatie monoclonală) cu semnificație nedeterminată (17).

Diagnosticul diferențial al ADC. Diseritropoieza cu multinuclearitatea eritroblaștilor apare în asociere cu multe boli hematologice care trebuie diferențiate de ADC.

ADC tip I poate fi confundat cu *anemiile megaloblastice*. În anemiile megaloblastice există anomalii și ale seriei granulocitare (metamielocite gigante, hipersegmentarea neutrofilelor) și megacariocitare (megacariocite cu nucleul „în explozie"). Dozarea nivelului acidului folic sau a vitaminei B_{12} în ser și testul Schilling pot contribui la precizarea diagnosticului.

Sindroamele talasemice pot avea un aspect morfologic similar cu al eritrocitelor (anizo-poikilocitoză) în sânge și sunt distinse de ADC prin prezența microcitozei marcate și prin creșterea Hb A_2 și a Hb fetale.

Anemiile sideroblastice câștigate și congenitale care se însoțesc de diseritropoieză sunt diferențiate de ADC prin prezența sideroblaștilor „inelari".

Sindroamele mielodisplazice, cauză majoră de diseritropoieză, se deosebesc de ADC prin prezența de anomalii morfologice concomitente și pe seria granulocitară și pe cea megacariocitară.

Eritroleucemia acută (M_6) în care se observă un număr mare de eritroblaşti bi- sau multinucleaţi trebuie diferenţiată de ADC tip II sau III. În ADC eritroblaştii sunt PAS-negativi, spre deosebire de eritroleucemie, în care sunt PAS-pozitivi.

Hemoglobinuria paroxistică nocturnă trebuie deosebită de ADC tip. II. Comportamentul serologic al eritrocitelor din ADC este particular. Testul de hemoliză acidă se produce numai cu 1/3 din serurile normale şi nu se produce cu serul propriu al bolnavului. Testul de liză apă-zahăr este negativ. HPN diferă de ADC şi prin alte aspecte: măduvă osoasă cu hiperplazie normoblastică fără diseritropoieză; hemosiderină în macrofage medulare absentă şi sideroblaşti absenţi, reticulocitoză marcată.

Tratamentul ADC. Nu există un tratament eficient. Transfuziile cu masă eritrocitară trebuie evitate cât mai mult timp posibil deoarece agravează hemocromatoza. Pentru reducerea depozitelor de fier s-au încercat chelatori de fier şi flebotomii. Splenectomia aplicată în unele cazuri de ADC tip II a dus la creşterea cifrei hemoglobinei.

BIBLIOGRAFIE

1. BEUTLER E., VALENTINE W. N.: The congenital dyserythropoietic anemias. In WILLIAMS W. J., BEUTLER E., ERSLEV A., LICHTMAN M. A. (eds.): Hematology, ed a IV-a. McGraw-Hill Inc., 1990.
2. CROOKSTON J. H., CROOKSTON M. C., ROSSE W. E.: Br. J. Haematol. 1972; 23 (suppl.): 83.
3. COLIŢĂ A. şi colab.: Third Meeting Intern. Soc. Haemat., Londra, 1975. Vol. 3 rezumate, 27, 14.
4. COLIŢĂ A. şi colab.: Rev. Roum. Méd. Int. 1976; 14: 63—69.
5. COLIŢĂ A., MOICEAN A., URSEA C. şi colab.: A VII-a Conferinţă Naţională de Hematologie, Bucureşti, 8—10 oct. 1992.
6. GOUDSMIT R. şi colab.: Br. J. Haematol. 1972; 23: 97.
7. HEIMPEL H., WENDT P.: Helv. Med. Acta 1968; 34: 103.
8. HEIMPEL H. şi colab.: Blood 1971; 37: 22.
9. HURBY M. A., MASON R. G., HONIG G. R.: Blood 1973; 42: 843.
10. FUKUDA M. N. şi colab.: Br. J. Haematol. 1984; 56: 55.
11. FUKUDA M. N., DELL A., SCARTEZZIN P.: J. Biol. Chem. 1987; 262: 7195.
12. GLADER E. B.: Congenital Dyserythropoietic Anemias. În Hoffman R. şi colab. (eds.): Hematology. Basic principles and practice. Churchill-Livingstone Inc., 1991.
13. LEWIS S. M., WERWULGHEN R. L.: Dyserythropoiesis. Acad. Press, Londra, New York, San Francisco, 1977, 407.
14. McBRIDE J. A., WILSON W. E. C., BAILLE D.: Blood 1971; 38: 837.
15. PARSONS S. F. şi colab.: Blood 1994; 83: 860.
16. SANDSTRÖM H. şi colab.: Eur. J. Haematol. 1994; 52: 42.
17. TOMITA A., PARKER M. J.: Blood 1994; 84: 250—259.
18. VAN DORPE A.: Dyserythropoietic anaemia. 3rd Meeting Europ. and African Div., Int. Soc. Haemat., 1975. Rezumate 20: 06.
19. VAINCHENKER W. şi colab.: Hematol. 1980; 8: 1057.
20. WEATHERALL D. J. şi colab.: Br. J. Haematol. 1973; 24: 681.
21. WERWILGHEN R. L.: Third Meeting Intern. Soc. Haemat., Londra, 1975. Rezumate vol. 3, 27: 01.
22. WICKKRAMASINGHE S. N., PIPPARD M. J.: J. Clin. Pathol. 1986; 39: 881.
23. ZDEBSKA E. şi colab.: Br. J. Haematol. 1987; 66: 385.

XXV

ANEMIA POST-HEMORAGIE ACUTĂ

DAN COLIȚĂ

Definiție — delimitare. Anemia post-hemoragie acută este forma de anemie care se instalează în urma scăderii rapide și unice a masei sanguine, provocată de o hemoragie externă sau internă.

Anemia este consecința directă a scăderii masei de eritrocite circulante. În situațiile în care hemoragia este redusă și se repetă pe perioade mai lungi, anemia care apare este consecința instalării depleției fierului tisular (vezi capitolul anemiei hipocrome feriprive).

Etiologie. De cele mai multe ori sediul hemoragiei este ușor de stabilit. Probleme mai speciale legate de precizarea sediului sângerării se ivesc în cazul hemoragiilor interne. Acestea pot fi exteriorizabile (vizibile) dacă au ca sursă tractul digestiv sau neexteriorizabile, dacă au loc în seroase (pleură, peritoneu), în spațiile interfasciale sau intramusculare, sau în focarele de fractură (după o fractură de femur sau de bazin, pierderile pot atinge valori de peste 1 litru) (2).

Aprecierea subiectivă sau anamnestică a pierderilor este adesea eronată: există tendința generală de a exagera pierderile externe și de a le subestima pe cele interne. Pentru o evaluare cât mai reală, atunci când cantitatea sângelui pierdut nu poate fi măsurată, practicianul trebuie să interpreteze cu obiectivitate simptomatologia clinică.

Fiziopatologie. Orice hemoragie antrenează o spoliere paralelă de eritrocite și de plasmă. Mecanismele de compensare și reparatorii evoluează în 2 faze succesive: compensarea hipovolemiei (restaurarea volumului plasmatic circulant) și repararea anemiei (restaurarea volumului globular total).

Reducerea volumului sanguin circulant este imediat sesizată de baroceptorii sinocarotidieni care stimulează centrii specifici bulbari și diencefalici. Aceștia comandă (prin căi simpatice și prin intermediul hipofizei și a suprarenalei) o vasoconstricție arterială și arteriolară selectivă, menită să adapteze rețeaua vasculară („conținătorul") la noua condiție

volemică („conținutul"). Vasoconstricția afectează cu precădere teritoriile periferice mai puțin sensibile la hipoxie (tegumente și mușchi), împreună cu unele teritorii splanhnice (tract digestiv și rinichi), favorizând redistribuirea sângelui către creier, cord, plămâni și ficat (8). Mecanismul vasomotor este dublat de un aflux de apă și de proteine (în special de albumine) din spațiile extravasculare. Proteinele extravasculare reprezintă o rezervă cu un ordin de mărime aproximativ egal cu cel al proteinelor circulante. Trecerea lor în circulație favorizează atragerea apei contribuind astfel la reconstituirea volemiei (într-un interval de 6—12 ore pot pătrunde în vase aproximativ 800—1 100 ml de apă și proteine) (2, 7). Disponibilitățile de apă sunt favorizate de reducerea filtratului glomerular (indusă de hipoirigarea renală amintită) și de retenția tubulară hidrosalină (comandată prin intermediul unei secreții crescute de aldosteron și de hormon antidiuretic — expresie a reacției generale de adaptare). Atragerea apei în circulație duce la scăderea în continuare a hematocritului (prin hemodiluție) în primele 2—3 zile după oprirea hemoragiei (3). Mecanismele descrise intervin succesiv în funcție de cantitatea sângelui pierdut. O pierdere până la 1 000 ml sânge poate fi compensată doar prin vasoconstricția venelor profunde și subcutanate. La pierderi mai mari, acest prim mecanism, cu durată scurtă, este urmat de instalarea tahicardiei și de redistribuirea sângelui din teritoriile splanhnice către circulația coronariană și cerebrală. Acest mecanism poate menține o tensiune arterială satisfăcătoare, dacă pierderile nu depășesc 20% din volumul circulant. Când pierderile depășesc 40%, tensiunea arterială se prăbușește. Hipoxia tisulară provoacă eliberarea de substanțe vasoactive și metaboliți acizi care combat efectul vasopresor al adrenalinei, provocând instalarea colapsului (starea de șoc). Fenomenele sunt agravate și de faptul că hipoxia este accentuată de fenomenul hemodiluției compensatorii. Paralel cu instalarea hipoxiei, se produce creșterea sintezei eritropoietinei. Valorile acesteia cresc logaritmic în raport cu reducerea lineară a hematocritului (1). Efectele imediate ale eritropoietinei sunt eliberarea mai rapidă a oxigenului din eritrocite și diabaza mai precoce a reticulocitelor din măduva osoasă (5). Concomitent ea acționează de maniera cunoscută pentru creșterea eritropoiezei. Răspunsul măduvei este dependent de integritatea sa structurală, de intensitatea anemiei și de starea rezervelor de fier și de catalizatori.

Tabloul clinic. Semnele clinice depind de mărimea și viteza sângerării, de intervalul de timp scurs de la producerea hemoragiei, de terenul general al bolnavului (starea aparatului cardiovascular, prezența altor boli asociate etc.).

Manifestările clinice inițiale se datoresc instalării rapide a hipovolemiei. Intensitatea lor este proporțională cu volumul de sânge pierdut. Semnele legate de prezența hipovolemiei domină de la început tabloul clinic. Semnele propriu-zise de anemie se instalează într-o a doua etapă, care urmează restaurării volumului circulant.

Cantitatea de sânge pierdut nu poate fi evaluată corect după valorile cifrice ale hemoglobinei sau ale hematocritului din cauza variațiilor compensatorii ale volemiei. Clinicianul este nevoit să facă această evaluare apreciind intensitatea semnelor funcționale. Această evaluare este redată în tabelul 25.1.

TABELUL 25.I

Semnele legate de apariţia rapidă a hipovolemiei la un adult tânăr, sănătos

Volumul de sânge pierdut		Semne clinice
% din total	ml	
10	500	În general absente. La aproximativ 5% din subiecţi apar semnele reacţiei „vasovagale"; slăbiciune, transpiraţii reci, hipotensiune şi chiar lipotimie
20—30	1 000—1 500	Asimptomatic în clinostatism. La ridicare apar: tahicardie, ameţeli, scădere uşoară a tensiunii arteriale, eventual lipotimii
30—40	1 500—2 000	Şoc hipovolemic. Simptomele sunt prezente şi în clinostatism: polipnee, transpiraţii reci, sete intensă, greţuri, adinamie, puls rapid şi filiform, hipotensiune, tendinţă la pierderea cunoştinţei
40—50	2 000—2 500	Şoc sever. Tensiunea arterială dispare. Puls imperceptibil. Sete de aer, transpiraţii reci, profuze. Colabarea jugularelor. Iminenţă de deces.

La o pierdere mai mică de 1 000 ml din volumul circulant, tahicardia şi scăderea presiunii arteriale nu reflectă fidel cantitatea pierdută, din cauza variabilităţii lor.

Interpretarea semnelor legate de prezenţa hipovolemiei trebuie corelată în mod obligatoriu cu condiţiile patologice asociate şi cu vârsta bolnavului.

După refacerea (spontană sau postterapeutică) a volumului circulant, pe primul plan trec semnele legate de deplеţia eritrocitelor circulante: paloare, dispnee de efort, tahicardie, ameţeli, sufluri anemice. Intensitatea lor depinde de gradul anemiei, de starea funcţională a aparatului cardiovascular şi de adaptarea organismului pacientului la condiţiile create de hipoxie. Astfel, indivizii tineri, normali, pot tolera o scădere cu 50—60% a *masei de eritrocite circulante*. În schimb, un tarat cardiovascular poate prezenta, la o reducere mai mică de 30%, semne de ischemie miocardică. Un pacient cu anemie cronică (de exemplu cu anemie aplastică) la care se adaugă o sângerare, poate suporta mai bine cifre joase ale hemoglobinei decât un subiect neadaptat la hipoxie.

Examene de laborator. Cel mai precoce semn sanguin al unei sângerări este apariţia bruscă (din prima oră) a trombocitozei, ce poate atinge chiar şi cifra de 1 000 000/mm^3 (6). Urmează leucocitoza ce poate atinge maximul (10 000—30 000/mm^3) după 2—6 ore (8). Valoarea hematocritului scade treptat în următoarele 2—3 zile după oprirea hemoragiei din cauza hemodiluţiei. La 3—5 zile de la hemoragie se instalează reticulocitoza, care ajunge la valoare maximă (10—15%) în 6—11 zile (6). După hemoragiile severe se constată prezenţa de eritroblaşti în sângele periferic.

Hematiile sunt normocitare normocrome, la individul normal înaintea accidentului hemoragic. Odată cu instalarea reticulocitozei apare un aspect dimorf în care alături de normocite, se constată macrocite policromatofile. Descoperirea hipocromiei trădează, de cele mai multe ori, existența unei carențe de fier anterioare episodului recent hemoragic.

Leucocitoza din primele ore este urmarea mobilizării granulocitelor adulte marginale din vasele sanguine și a rezervei medulare mobile. Ulterior apare deviația la stânga a formulei leucocitare.

În măduva osoasă, se constată instalarea hiperplaziei eritroblastice, după 3—5 zile de la hemoragie.

În hemoragiile intracavitare se produce hiperbilirubinemia prin resorbția sângelui revărsat (7).

Hemoragia intestinală este urmată de creșterea azotemiei (8).

Diagnostic. În general nu există probleme de diagnostic al mecanismului de producere a anemiei. Numai anemia apărută în urma unei hemoragii într-o cavitate, însoțită de icter și febră, poate fi confundată cu anemia prin hemoliză acută apărută brusc. Dilema este tranșată de descoperirea sediului hemoragiei.

De asemenea, de cea mai mare importanță practică este să se precizeze dacă hemoragia produsă este de cauză locală, dacă reprezintă manifestarea unei diateze hemoragice sau reprezintă primul semn de boală al unei hemopatii maligne.

Evoluție. O măduvă normală poate compensa o hemoragie acută, dacă are materialele necesare. S-a constatat că, indiferent de mărimea pierderii, ritmul regenerării eritrocitelor decurge astfel încât un nivel aproximativ de 4,5 milioane eritrocite/mm^3 poate fi atins în jur de 33 zile (8). După 10—14 zile de la oprirea hemoragiei semnele de regenerare activă eritrocitară dispar. Leucocitoza se normalizează după 3—4 zile.

Persistența hiperplachetozei și/sau a reticulocitozei poate constitui un indiciu al persistenței hemoragiei. În mod similar, menținerea leucocitozei sugerează continuarea hemoragiei (îndeosebi într-o cavitate din organism) sau instalarea unei infecții.

Tratament. În ordinea urgenței, tratamentul stării de șoc (refacerea volumului circulant) și măsurile pentru oprirea hemoragiei prin procedee medicale sau/și chirurgicale, primează față de tratamentul anemiei (restaurarea masei de eritrocite).

Mijloacele de refacere a volemiei sunt: soluțiile macromoleculare (în special cele de dextrani), soluțiile de proteine plasmatice, soluțiile cristaloide și sângele.

Tactica terapeutică este dictată de cantitatea de sânge pierdută, care se apreciază după criteriile expuse și de prezența sau absența tarelor cardiovasculare asociate. Pentru stabilirea cantităților corespunzătoare de lichide, necesare refacerii volumului circulant, este necesar să se aprecieze volemia pacientului și pierderile actuale. În tabelul 25.II sunt expuse criteriile de evaluare ale volemiei la adulții normali în funcție de talie și de sex (4).

Dextranii reprezintă terapia de elecție a pierderilor sub 1 000 ml. Soluția 6% de dextran cu greutatea moleculară 70 000 are efect mai

TABELUL 25.II

Criterii de evaluare ale volemiei la adulți normali

Tip constituțional \ Sex	Bărbat	Femeie
Cu musculatură dezvoltată	7,5%*	7,0%
normal	7,0%	6,5%
slab	6,5%	6,0%
obez	6,0%	5,5%

* % din greutatea corporală.

prompt și mai durabil decât soluțiile de dextrani cu greutatea moleculară mică.

Administrarea sângelui nu este totdeauna necesară, dacă pierderile nu depășesc 20% din masa circulantă și dacă pacientul nu este un tarat cardiovascular.

Când pierderile depășesc 1 200—1 500 ml devine necesar ca volumele de restaurare să fie compuse atât din dextran, cât și din sânge total (4, 8).

Un criteriu clinic util pentru aprecierea gravității hemoragiilor cu debit mare este urmărirea tensiunii arteriale și a pulsului. Cu cât pierderea însumează un procentaj mai mare din masa sanguină, cu atât TA devine mai scăzută și pulsul mai accentuat, ajungând ca raportul dintre ele să atingă valori subunitare. Reducerea cu circa 1/3 din masa sanguină poate determina scăderea TA maximă la 8—9 cm Hg și necesită un volum de sânge de aproximativ 1 500 ml. O scădere sub 6 cm Hg a maximei corespunde adesea înjumătățirii masei sanguine și obligă la administrarea unor cantități de sânge de peste 2 000 ml. Aportul transfuzional trebuie să fie rapid, calea intravenoasă fiind preferabilă. În urgențele extreme se poate utiliza concomitent 2 vene periferice sau se implantează un cateter central (cu avantajul monitorizării mai corecte a presiunii venoase). Riscul provocării unei reluări a hemoragiei după substituție largă nu a fost formal dovedit (2). Realizarea hemostazei chirurgicale, când este necesară, poate fi îndeplinită la cifre tensionale de peste 9 cm Hg sub control transfuzional. Supravegherea hemostazei (numărarea trombocitelor, evaluarea coagulabilității) și administrarea unor cantități mici de calciu sunt recomandabile pentru prevenirea unor complicații legate de introducerea cantităților mari de sânge conservat.

Soluțiile cristaloide pot fi folosite, în situații de urgență, când lipsesc ceilalți înlocuitori de plasmă sau sângele izogrup. Sunt necesare volume mari (2—3 litri în 15—20 minute), iar efectul lor este efemer. Soluțiile cristaloide cu concentrații mari de glucoză trebuie evitate, deoarece pot produce o diureză osmotică, ce scade volumul vascular.

Administrarea de substanțe vasopresoare este, în general, contraindicată (3).

Răspunsul la terapie se evaluează după culoarea și temperatura tegumentelor, starea de umplere a venelor (de exemplu a jugularelor),

dispariția fenomenelor de anoxie, creșterea tensiunii arteriale și menținerea acesteia la cifre corespunzătoare.

După depășirea perioadei critice, tratamentul anemiei se reduce, de regulă, la măsuri igieno-dietetice: repaus, alimentație bogată în proteine, vitamine și minerale (cu ajustările impuse de prezența unei afecțiuni digestive). Medicamentele „antianemice" (vitamina B_{12}, acidul folic, fierul etc.) sunt de regulă inutile, la indivizii la care nu s-a obiectivat între timp existența carențelor respective. Dacă măduva este normală și stocul de fier adecvat, regenerarea spontană a pierderii este totdeauna constatată.

Transfuziile de sânge pot fi folosite în cazurile în care este necesară o corectare rapidă a anemiei, ca de exemplu necesitatea unei intervenții chirurgicale.

Concomitent cu măsurile terapeutice ce se adresează combaterii și corectării consecințelor hemoragiei se va face și tratamentul cauzei hemoragiei, care poate fi uneori chirurgical (de exemplu în ruptura de sarcină extrauterină cu inundație peritoneală, în unele hemoragii digestive etc.) sau medical (de exemplu, medicația adecvată când hemoragia se datorește unor tulburări de hemostază).

BIBLIOGRAFIE

1. ADAMSON J. W.: Blood 1986; 32: 320.
2. ANDRÉ R.: În Dreyfus B., Breton-Gorius J., Rochant H., Reyes F., Vernent J. P. (eds.): Hématologie. Edit. Flammarion. Médecine-Science, Paris, 1986.
3. CHIOTAN N., CRISTEA I.: Șocul, Edit. Medicală, București, 1986.
4. CRIVDA S., MANDESCU R.: Tehnici curente de reanimare, Edit. Medicală, București, 1968.
5. HILLMAN R. S.: J. Clin. Invest. 1969; 48: 443.
6. HILLMAN R. S.: În WILLIAMS W. J., BEUTLER E., ERSLEV A. J., RICHTMAN M. A. (eds.): Hematology. McGraw-Hill Book Comp., New York, 1990, 700.
7. WASSERMAN K., JOSEPH J. D., MAYERSOHN H. S.: Am. Physiol. 1956; 184: 175.
8. WINTROBE M. N., LEE G. R., BOGGS D. R., BITHELL T. C., ATHENS J. W., FOERSTER J.: Clinical Hematology, Lea-Febiger, Philadelphia, 1981, 679.

XXVI

ANEMIILE HEMOLITICE MECANISME, CLASIFICARE, DIAGNOSTIC

DAN COLIȚĂ

Hemoliza (gr.: *haima*=sânge; *lusis*=distrugere) este procesul de îndepărtare a eritrocitelor din circulație. În condiții fiziologice ea reprezintă mecanismul prin care sunt sustrase din circulație eritrocitele îmbătrânite. Către sfârșitul existenței, eritrocitele dobândesc unele atribute fizice și imunologice defavorabile: devin mai rigide și exprimă un antigen de senescență, încastrat într-o proteină membranară („banda 3"). Rigidificarea stânjenește strecurarea eritrocitelor senescente prin cordoanele splenice unde sunt supuse unui stres metabolic insuportabil. Antigenicitatea trezește o ripostă autoimună: autoanticorpii, de clasă IgG, învelesc eritrocitele și mediază aderarea lor la receptorii pentru Fcγ exprimați de macrofagele rezidente din splină. Aderarea eritrocitelor pe macrofage este urmată de ingurgitarea și de digerarea lor. Splina este, în consecință, creditată ca cel mai important organ de selectare și eliminare a eritrocitelor îmbătrânite (7). Procesul descris poartă numele de hemoliză extravasculară (intratisulară) și este mecanismul prin care aproximativ 90% dintre eritrocitele senescente sunt eliminate. Circa 5—10% dintre eritrocite sunt lizate în mod normal și în circulația generală (hemoliză intravasculară), proces în care hemoglobina este deversată în plasmă și apoi prelucrată în ficat și în rinichi (4). Aceste pierderi naturale din sistem sunt continuu înlocuite de o producție egală de reticulocite elaborate de măduva osoasă. În acest mod întreaga cantitate de eritrocite normale ajunge să fie primenită în aproximativ 3 luni, menținându-se, totodată, în circulație un număr normal de elemente.

Spre deosebire de hemoliza normală care operează asupra unui lot redus de eritrocite (circa 200 de miliarde de elemente distruse zilnic dintr-un total de 25 000 de miliarde cât reprezintă masa eritrocitară totală a adultului) (9), limitându-se numai la cele care au atins limita lor de existență (~120 de zile), hemoliza patologică acționează fără discer-

nământ asupra tuturor eritrocitelor existente în circulație, provocând distrugerea prematură a unei cantități supranormale de celule pe unitatea de timp. Scurtarea duratei de viață a eritrocitelor este criteriul major care definește hemoliza patologică și o diferențiază de cea normală (fiziologică). Riposta organismului la această risipă constă dintr-o creștere compensatorie a producției de eritrocite de către măduva osoasă (hiperreticulocitoză). Eșantioanele de măduvă recoltate prin aspirate arată o hiperplazie importantă a seriei eritroide în detrimentul zonelor de măduvă grasă care se restrâng. Această creștere a producției de eritrocite poate atinge valori de 7 ori mai mari decât cele bazale (normale). Dacă distrugerea prin hemoliză a eritrocitelor este compensată integral de regenerarea medulară, numărul de eritrocite circulante rămâne în limite normale. Această situație este denumită „stare de hemoliză" sau „hemoliză compensată". *Anemia hemolitică* este, în schimb, o „hemoliză necompensată" în care capacitatea măduvei de a acoperi pierderile prin hemoliză este depășită. În anemiile hemolitice durata de viață a eritrocitelor circulante este mai mică decât 17 zile (120:7).

Mecanismele hemolizei patologice sunt identice cu cele ale hemolizei fiziologice; ele pot fi extravasculare sau/și intravasculare.

Hemoliza extravasculară este mediată de fagocitarea eritrocitelor de către celule macrofage. Dinamica evenimentelor intracelulare care urmează după încorporarea eritrocitelor în macrofage a putut fi urmărită la nivel infrastructural: alterare inițială a membranei eritrocitare (cu liza parcelară a acesteia), urmată de precipitarea intracelulară a hemoglobinei și de trecerea agregatelor de hemoglobină în citoplasma macrofagului (5). Catabolizarea eritrocitelor fagocitate este, în esență, un proces prin care sunt recuperate pentru noi sinteze cele mai multe dintre componentele structurale ale hemoglobinei: aminoacizii din compoziția globinei și fierul din compoziția hemului. În schimb, inelul protoporfirinic este descompus în monoxid de carbon (CO) și bilirubină, forme sub care este eliminat prin aerul expirat și, respectiv, prin bilă. Dovada proveniență bilirubinei din inelul protoporfirinic a fost furnizată de modele experimentale, în care s-au utilizat eritrocite non-viabile al căror hem a fost marcat cu C^{14}: din primele 30′ după perfuzarea acestora, în bilă se decelează bilirubina marcată (8). Etapele transformării protoporfirinei în bilirubină indirectă (BRI) în citoplasma macrofagelor, transferul acesteia la hepatocite unde prin conjugarea cu acid glicuronic este transformată în bilirubină hidrosolubilă „directă" (BRD) sau conjugată, care se elimină prin bilă în intestin, transformarea intestinală a BRD în urobilinogen (Ubg), reciclarea enterohepatică a Ubg și deversarea acestuia în urină au fost expuse în capitolul privind „seria eritrocitară".

Diagnosticul curent al hemolizei se bazează pe 2 grupe de semnale indirecte: 1) teste biochimice care semnalează hipercatabolismul protoporfirinei (hiperdistrucția eritrocitelor): hiperbilirubinemia indirectă și descărcările de Ubg în urină și 2) semnale morfologice ale hiperproducției compensatorii de eritrocite: reticulocitoza sanguină și hiperplazia seriei roșii în măduva osoasă. Deoarece ficatul are o mare capacitate de prelucrare a BR, valorile BRI și intensitatea descărcării urinare a Ubg nu se corelează perfect cu intensitatea hemolizei. Dacă ficatul este indemn, titrul BRI nu va fi mai mare de 3—4 mg/dL, oricât de mare ar fi intensitatea hemolizei,

deoarece ficatul normal poate excreta în 24 de ore toată bilirubina rezultată din catalizarea a 12,5 g de hemoglobină (10). La fel urobilinogenuria (care este mai mult un test calitativ) nu este decât un simplu indicator al creşterii turnover-ului pigmentului. Aprecierea mai exactă a reticulocitozei necesită adesea aplicarea formulei de corecţie şi calcularea indicelui de producţie (v. cap. „Clasificarea anemiilor"). Dacă măduva este normală, gradul de hiperplazie eritroidă este paralel cu intensitatea hemolizei. Pe frotiurile efectuate din măduva aspirată raportul granulo-eritroblastic apare adesea micşorat (uneori chiar inversat), iar ochiurile de grăsime se şterg până la dispariţie. Eritroblaştii au uneori talie mai mare (macronormoblaşti). Ei nu trebuie confundaţi cu megaloblaştii care apar în anemii hemolitice cronice complicate cu carenţă de acid folic (2).

Hemoliza intravasculară este procesul prin care eritrocitele sunt lizate în circulaţie, cu eliberarea în plasmă a hemoglobinei (Hb) care se disociază imediat în dimeri $\alpha\beta$. Dimerii $\alpha\beta$ sunt eliminaţi rapid din circulaţie prin 2 mecanisme, unul dependent şi celălalt independent de proteine transportatoare. Dimerii captaţi de proteine sunt transportaţi la ficat unde vor fi catabolizaţi în modul descris mai sus. Dimerii liberi străbat filtrul glomerular şi vor fi resorbiţi de celulele epiteliale ale tubilor proximali în care vor fi degradaţi, dar cu particularitatea că fierul va rămâne depozitat în citoplasma acestora sub formă de hemosiderină. Celulele epiteliale din stratul superficial, încărcate cu hemosiderină se descuamează în lumen. Ele ajung în urina finală, unde vor fi decelate în sedimentul urinar prin reacţia Perls (testul de hemosiderină urinară). Hiperbilirubinemia indirectă şi urobilinogenuria sunt, prin urmare, markeri ai ambelor tipuri de hemoliză, în timp ce hemosiderinuria este specifică numai hemolizei intravasculare.

Plasma conţine 3 proteine capabile să fixeze dimerii de Hb: haptoglobina care se ataşează specific pe globină şi hemopexina şi serumalbumina care se ataşează pe hem. Prima care intră în acţiune este haptoglobina (HPG). Cantitatea de HPG disponibilă pentru legarea dimerilor este de 50—200 mg/dl. Ea poate fi aproape complet epuizată dacă în sânge sunt lizate rapid 1—2 ml de eritrocite (4). Complexele HPG—Hb sunt captate de ficat în aproximativ 10 minute. Reducerea titrului HPG libere reprezintă cel mai fidel indicator al apariţiei Hb în plasmă. (Un consum moderat de HPG are loc şi în cazul hemolizei extravasculare, ca rezultat al „scurgerii" unor mici cantităţi de Hb din macrofage, însă niciodată nu atinge amploarea observată în hemoliza intravasculară, în care titrul HPG este literalmente prăbuşit.) (1). După consumarea completă a HPG, rămân dimeri $\alpha\beta$ liberi în plasmă, care se va colora în roz. Moleculele de dimeri, nelegate de HPG, care nu ajung să treacă în urină, suferă un proces de oxidare a fierului (care devine trivalent) şi o dezasamblare în methem şi globină. Moleculele libere de methem sunt rapid captate de hemopexină (HPX) şi transportate la ficat unde vor fi transformate în BRI. Capacitatea HPX de legare a methemilor este de 50—100 mg/dl (4), dincolo de care methemii sunt preluaţi de serumalbumină cu care formează complexe de met-hem-albumină de culoare brună. Aceste complexe persistă în plasmă până la apariţia de noi molecule de HPX produse de ficat, întrucât albumina nu poate transfera methemii prin membrana hepatocitelor.

După un puseu unic de hemoliză intravasculară hemoglobina poate fi decelată în plasmă și în urină timp de numai câteva ore, depleția haptoglobinei durează mai multe zile, iar hemosiderina este detectabilă în urină mai multe săptămâni. Hemosiderinuria este indicatorul cel mai valoros al unei hemolize intravasculare cronice. Capacitatea de captare a celulelor tubulare este de aproximativ 5 g Hb/24 ore (6). Dacă irupția Hb în nefroni este bruscă și masivă, mecanismul retroresorbției este depășit și Hb ajunge ca atare în urina finală care capătă culoare rubinie (hemoglobinurie). Hemoglobinuria este semnalul puseurilor de hemoliză intravasculară intensă. În hemolizele intravasculare de lungă durată pierderile cronice de fier prin urină se soldează cu carență marțială care se traduce prin apariția de eritrocite microcitare hipocrome în sânge.

Clasificarea anemiilor hemolitice (AH). Două condiții majore pot provoca o distrucție prematură a eritrocitelor în circulație: 1) producerea unor eritrocite cu defecte structurale care le fac inapte să supraviețuiască timp îndelungat, deși condițiile mediului lor de viață sunt normale și 2) apariția unor alterări ale acestui mediu de viață (plasmă sau vase) care agresează eritrocitele (care sunt normale) și provoacă eliminarea lor rapidă din circulație. Pe aceste baze AH se împart în 2 clase principale: AH „intracorpusculare" sau „endoeritrocitare" și AH „extracorpusculare" sau „exoeritrocitare" (tabelul 26.I). AH prin defecte eritrocitare sunt aproape în totalitate boli ereditare (face excepție hemoglobinuria paroxistică nocturnă, în care alterarea structurală a membranei se produce în cursul vieții bolnavului). AH exoeritrocitare sunt toate dobândite și, cu excepția AH autoimune idiopatice, apar în circumstanțe etiopatogenice evocatoare.

Diagnosticul AH. Semnul clinic comun tuturor formelor de hemoliză este subicterul. Dacă hemoliza este necompensată, subicterul se însoțește și de simptomele anemiei (paloare, astenie, ameteli, acufene, dispnee și senzații de palpitații la efort). Intensitatea exprimării acestor simptome variază în funcție de modul acut sau cronic în care s-a instalat anemia, ca și de rezerva adaptativă a aparatului cardiovascular al pacientului la starea de hipoxanemie.

Semnele și simptomele descrise sunt nespecifice: ele sugerează doar posibilitatea existenței hemolizei și impun 3 etape de investigare: confirmarea existenței hemolizei, precizarea mecanismului hemolizei și elucidarea cauzei acesteia.

Hiperbilirubinemia indirectă, descărcările urinare crescute de urobilinogen, hiperreticulocitoza și hiperplazia eritroidă a măduvei osoase sunt cei 4 markeri comuni ai existenței hemolizei. La aceștia se poate adăuga și creșterea în ser a lacticodehidrogenazei liberate din eritrocitele hemolizate. Ei au valoare diagnostică numai dacă se asociază în această configurație completă. O serie de afecțiuni însoțite de anemie, de icter sau de semne de regenerare medulară, asociate în diverse combinații, pot fi confundate cu o anemie hemolitică. Astfel, o hiperbilirubinemie indirectă izolată poate fi semnalul unei hemoragii în seroase sau în țesuturi (hematoame profunde, de exemplu), ca și cel a unor rare ictere familiale (Gilbert, Criggler-Najjar). La bolnavul anemic, cifra procentuală a reticulocitozei trebuie interpretată cu rezerve. Adesea este necesară operarea unor corecții în funcție de gradul anemiei, ca și calcularea indice-

TABELUL 26.1

Clasificarea anemiilor hemolitice (AH)

I. *AH intracorpusculare*

1. Defecte de membrană
   - Sferocitoza ereditară
   - Eliptocitoza ereditară
   - Piropoikilocitoza ereditară
   - Stomatocitoza ereditară
   - Acantocitoza ereditară
   - Xerocitoza ereditară
   - Deficiența de LCAT (lecitin-colesterol aciltransferază)
   - Hemoglobinuria paroxistică nocturnă
2. Defecte enzimatice (enzimopatii)
   - Enzime ale glicolizei anaerobe: piruvat kinază, hexokinază, glucozo-fosfat izomerază, fosfofructokinază, aldolază etc.
   - Enzime ale șuntului pentozelor: glucozo-6-fosfat dehidrogenază
   - Enzime ale metabolismului glutationului: glutation reductază, glutation peroxidază, glutation sintetază
   - Altele: adenilat kinază, adenozintrifosfatază
3. Defecte ale globinei
   - Anomalii structurale
     Hemoglobinopatiile S, C, D, E, O Arab . . .
     AH cu hemoglobine instabile (Köln, Zurich . . .)
     Hemoglobinoze M (Boston, Iwate, Hyde Park . . .)
   - Sindroame talasemice
   - Stări dublu heterozigote: S/Tal, S/C, S/D, C/Tal

II. *AH extracorpusculare*

1. Prin anticorpi
   - alloanticorpi: reacții posttransfuzionale, boala hemolitică a nou-născutului
   - autoanticorpi: AH autoimune (AHAI) cu anticorpi la cald și la rece
     AHAI idiopatice
     AHAI secundare: infecții (*mycoplasma*, virus Epstein-Barr, citomegalovirus), colagenoze (LED — în primul rând), boli limfoproliferative (leucemia limfatică cronică, boala Waldenström, limfoame nonHodgkin), alte cancere (ovar), medicamente (αmetildopa)
2. Prin agenți infecțioși: malaria, toxoplasma, leishmania, bartonella, *Clostridium Welchii*
3. Prin medicamente:
   - mecanism prin complexe imune (mecanismul „spectatorului inocent"): Stibophen, chinidină, chinină, fenacetină, sulfonamide, tiazide, clorpromazină, izoniazidă
   - mecanism „haptenic": penicilină, cefalosporine
4. Prin agenți chimici: plumb, cupru, zinc, arsenic, apă
5. Prin agenți fizici: arsuri întinse, radiații ionizante
6. Prin factori traumatici: proteze valvulare, coagulare intravasculară diseminată, sindromul hemolitic uremic, purpura trombocitopenică trombohemolitică, hemoglobinuria de marș
7. Hipersplenism

lui de producție de reticulocite. Asocierea anemie+reticulocitoză în absența hiperbilirubinemiei sugerează mai degrabă o hemoragie internă decât o hemoliză, sugestie care este întărită dacă se asociază și o hiperplachetoză. Dacă asocierea de mai sus se însoțește, de tabloul leucoeritroblastic al formulei sanguine, sunt de suspectat o infecție severă sau o invadare a măduvei osoase, fie cu celule neoplazice, fie printr-un proces de mielofibroză. Triada anemie+bilirubinemie (ușor crescută)+reticulocitopenie trădează un proces de eritropoieză ineficientă (în esență tot un proces de liză celulară, dar care operează la nivel central asupra eritroblaștilor medulari). Inspecția plasmei (în tubul de hematocrit de exemplu) și urinei bolnavului poate furniza, la rândul său, unele orientări diagnostice. În hemoliză, în general, plasma și urina au o culoare galben-închisă. O hemoliză intravasculară poate fi suspectată dacă se constată eliminarea de urini roșii-rubinii sau dacă anamnestic este evocat un astfel de eveniment. Suspiciunea este mult întărită dacă și plasma bolnavului are culoare roz (în alte situații care produc colorarea în roșu a urinei — porfirinuria, mioglobinuria, administrarea de pirazolonice — plasma are culoare normală). Dacă evenimentul hemoglobinuric a avut loc imediat înaintea consultării bolnavului, testul cel mai relevant este demonstrarea hemoglobinuriei prin metoda spectroscopică. Dacă evenimentul s-a produs cu câteva zile înaintea examinării, diagnosticul se bazează pe evidențierea hemosiderinuriei („sedhela" trecerii hemoglobinei prin filtrul glomerular). Metoda curentă de analiză utilizează ferocianura de potasiu (reacția Perls) (3). Este posibilă și o investigare rapidă, orientativă, pe lamă, cu ajutorul sulfurii de amoniu (soluție apoasă 30%): o picătură din sedimentul obținut prin centrifugarea probei de urină se amestecă cu o picătură de reactiv. Granulele de sulfură ferică ce rezultă, pot fi decelate în celulele epiteliale în interiorul cilindrilor sau risipite în câmpul microscopic (10).

După certificarea existenței hemolizei, este necesară și obligatorie elucidarea cauzelor acesteia. Primele orientări le furnizează anamneza dirijată și inspecția frotiului de sânge. Pentru orientarea anamnestică se va ține cont de câteva jaloane:

1) Cele mai frecvente AH sunt cele dobândite; 2) vor fi anchetate obligatoriu: utilizarea (accidentală, empirică sau prin ordonanță medicală) unor medicamente, expunerea la substanțe chimice, posibilitatea corelării cu episoade infecțioase; 3) la tinerii la care se suspectează o AH ereditară se vor cere date asupra consanguinilor (puseuri de icter sau de „hepatită", crize biliare sau colelitiază documentată medical sau postcolecistectomie, ablația unei splenomegalii fără documentare medicală precisă); 4) precizarea împrejurărilor în care s-a produs eliminarea urinilor suspecte de hemoglobinurie (la micțiunea matinală — suspiciune de hemoglobinurie paroxistică nocturnă; după un medicament — posibilitatea unei deficiențe de glucozo-6-fosfat-dehidrogenază sau semnal pentru o hemoglobină instabilă; după expunerea la temperatură joasă — suspiciune de hemoglobinurie paroxistică *a frigore;* după alergare prelungită — suspiciune de hemoglobinurie de marș).

Inspecția frotiului de sânge este cel mai important examen de triaj pentru aprecierea mecanismului etiopatogenic al unei AH. În capitolul „Clasificarea anemiilor" au fost prezentate aspectele morfologice ale eritrocitelor care pot avea valoare diagnostică orientativă. Aici vom co-

menta doar interpretarea unor tablouri morfologice care se asociază mai frecvent cu AH: dominanța hipocromiei, prezența eritrocitelor în semn de tras la țintă, microsferocitoza și apariția eritrocitelor fragmentate.

1. Imensa majoritate a AH sunt normocrome. *Asocierea hipocromiei* cu un proces hemolitic evocă 2 situații: o hemoglobinopatie (talasemie sau hemoglobinoză E) și asocierea cu o carență de fier (instalată accidental sau ca o complicație a unei hemolize intravasculare cronice). β talasemia este cea mai răspândită hemoglobinopatie din țara noastră, iar formele sale heterozigote pot fi atât de paucisimptomatice încât să ajungă să fie diagnosticate doar întâmplător. Pentru β talasemia heterozigotă pledează: a) asocierea hipocromiei cu o mare dezordine a tabloului eritrocitar (anizocitoză, poikilocitoză, frecvente elemente în semn de tras la țintă, eritrocite cu punctații bazofile, eritroblastemie); b) evidențierea unor modificări scheletale discrete (proeminența pometilor obrajilor, bolta palatină ogivală, craniul „în turn"); c) o splenomegalie discretă. O carență de fier prin pierderi de sânge demonstrate (digestive sau genitale) poate surveni accidental la un subiect cu tară talasemică ignorată în prealabil. Două observații ar putea fi semnale pentru această asociere: 1) aspectul frotiului de sânge în care frapează dezordinea eritrocitară care este mult mai pronunțată decât ceea ce se observă în mod obișnuit în anemia feriprivă și 2) modelul reparării anemiei după terapia marțială, în care se remarcă două aspecte: oprirea creșterii hemoglobinei la o valoare subnormală (pragul stării talasemice), în condițiile rezolvării cauzei sângerărilor care au provocat carența de fier și menținerea hipocromiei, chiar și după reumplerea depozitelor de fier. Diagnosticarea talasemiei se face prin electroforeza hemoglobinei, dar pentru evitarea rezultatelor fals negative, această explorare trebuie efectuată la un interval de timp după începerea terapiei marțiale, suficient de lung pentru ca să se fi produs depunerea fierului în rezervoarele tisulare.

Hemoliza intravasculară cronică produce în mod inerent o pierdere continuă de fier prin urină (demonstrabilă prin testul hemosiderinuriei). Există forme de hemoliză intravasculară de intensitate minimă care rămân mult timp compensate și asimptomatice fără să se complice cu atacuri acute de hemoglobinurie revelatoare). În aceste condiții anemia se instalează tardiv, ca efect al spolierii rezervelor de fier și are caracter microcitar-hipocrom. Din acest motiv, în anemiile feriprive în care nu se poate demonstra existența sângerărilor (digestive sau genitale) este obligatorie cercetarea existenței unei hemolize intravasculare. Modelele curente de boală sunt hemoglobinuria paroxistică nocturnă (HPN) și anemia hemolitică microangiopatică (AHM). În favoarea HPN pledează: prezența (inconstantă) a leucotrombocitopeniei, prăbușirea scorului fosfatazei alcaline leucocitare și pozitivarea testelor specifice (testul cu sucroză și testul HAM). AHM trebuie suspectată totdeauna dacă pe frotiurile de sânge se observă numeroase eritrocite fragmentate (schizocite).

2. În zona noastră geografică, *prezența eritrocitelor în semn de tras la țintă* la un subiect cu anemie hemolitică evocă β talasemia. La pacienții de rasă neagră pot fi suspectate și alte hemoglobinopatii (C, D, O Arab), în timp ce la asiatici sunt de considerat α talasemia și hemoglobinoza E. Combinații dublu heterozigote S/Tal, S/C, S/D, E/Tal sunt posibile. Diagnosticul este precizat prin electroforeza hemoglobinei. Uscarea lentă a

frotiului de sânge permite cristalizarea intracelulară a hemoglobinei C, facilitând diagnosticul acestei anomalii.

3. *Sferocitoza* este un semnal de leziune ereditară sau dobândită a membranei eritrocitare. Microsferocitele apar pe frotiurile de sânge în mai multe situații: microsferocitoză ereditară, AH imune, AH cu corpi Heinz, unele hemolize induse de medicamente, hipersplenism, arsuri întinse, hipofosfatemie. Triajul începe cu testul Coombs direct deoarece AH imune sunt cele mai frecvente AH în care apare microsferocitoză. Imunohemoliza poate fi provocată de alloanticorpi, de autoanticorpi sau de medicamente. AH autoimune (AHAI) primează la adult, ca forme primare (idiopatice) sau secundare (vezi tabelul 26.I). În funcție de temperatura optimă la care se cuplează cu antigenele eritrocitare autoanticorpii pot fi activi la cald sau la rece. Autoanticorpii activi la cald sunt molecule de IgG, neactivatoare de complement, care rămân atașate pe antigenele Rh și la 37°C. Datorită acestei proprietăți pot fi evidențiate pe suprafața eritrocitelor prin testul Coombs direct cu ser monospecific anti-IgG. Autoanticorpii activi la rece sunt molecule de IgM sau specii moleculare de IgG, distincte de cele discutate mai sus. La temperatură scăzută (+4°C *in vitro*) se atașează cu maximum de aviditate pe antigene eritrocitare specifice, împreună cu molecule de complement care se activează progresiv pe eritrocite. Anticorpii rămân atașați pe eritrocite numai până la un anumit prag termic, după care se desprind lăsând pe loc molecule activate de complement („martorii" procesului). Acestea pot fi depistate pe eritrocite cu ajutorul testului Coombs direct cu ser anticomplement (anti non γ). În afara acestei comportări asemănătoare, autoanticorpii la rece IgM și IgG se deosebesc între ei printr-o serie de proprietăți specifice. IgM se atașează pe antigenele grupului Ii și produc *in vitro* (totdeauna) și *in vivo* (uneori, în funcție de înălțimea pragului termic), aglutinarea eritrocitelor. Diagnosticul bolii cu aglutinine la rece se bazează pe 3 elemente: 1) demonstrarea aglutinării *in vitro;* 2) test Coombs direct pozitiv cu ser anticomplement și 3) test Coombs indirect pozitiv cu ser anti IgM. Uneori diagnosticul este sugerat și de inspecția frotiului de sânge dacă pe lamă apare autoaglutinarea eritrocitelor. IgG active la rece se atașează pe antigenele sistemului P și produc *in vitro* și *in vivo*, prin intermediul complementului activat până la etapa finală (formarea complexelor de atac ale membranei), hemolizarea eritrocitelor-țintă. Prezența acestor specii de anticorpi în serul bolnavului poate fi demonstrată printr-un test în 2 timpi (3); răcirea puternică a suspensiei de eritrocite în ser (prin incubare la gheață timp de 60 de minute), urmată de încălzirea rapidă la 37°C, produce hemoliza (de aici li s-a dat numele de „hemolizine bifazice"). Anticorpii bifazici produc *in vivo* accese de hemoliză intravasculară după expunerea pacientului la temperaturi scăzute (așa-numita hemoglobinurie paroxistică *a frigore*). După diagnosticarea unei AHAI, indiferent de tipul serologic (la cald sau la rece) este obligatorie cercetarea activă a bolilor incriminate în producerea sa (vezi tabelul 26.I). Numai după eliminarea acestora poate fi formulat diagnosticul de AHAI idiopatică. Un test Coombs direct anticomplement pozitiv, în absența demonstrării aglutinării sau a hemolizei nu are semnificație diagnostică pentru AHAI (traduce, cel mai probabil, o atașare pasivă de complexe imune circulante pe eritrocite).

În AH induse de medicamente, testul Coombs devine pozitiv numai în prezența medicamentului cauzal.

Sferocitoza ereditară se transmite după modelul mendelian, fără predilecție de rasă. Criteriile esențiale pentru diagnostic sunt: criterii de hemoliză extravasculară, rezistența osmotică scăzută a eritrocitelor, autohemoliză crescută corectabilă după adaos de glucoză în mediul de incubare, stigmate similare la consanguini, splenomegalie minimă sau moderată.

4. *Schizocitoza* (prezența eritrocitelor fragmentate pe frotiurile de sânge în proporție mai mare de 1%) traduce o hemoliză intravasculară mecanică. Se observă în AHM și la purtătorii de valve cardiace sau de proteze vasculare. AHM este o condiție fiziopatologică cu cauze diferite: sindrom de coagulare intravasculară diseminată (CID), purpură trombotică trombocitopenică (PTT), sindrom hemolitic uremic (SHU), hipertensiune malignă, cancere diseminate, poliarterită nodoasă, lupus eritematos diseminat, eclampsie, hemangioame gigante, SIDA. În AHM prezența eritrocitelor fragmentate în număr mare se asociază în mod caracteristic cu scăderea numărului trombocitelor la limita inferioară a normalului sau sub această limită. CID este un mecanism intermediar de boală care complică o serie de boli sau sindroame (septicemii cu gram-negativi, cancere metastazate, leucemia acută promielocitară, retenție de făt mort, dezlipirea prematură a placentei). Este o stare de hipercoagulabilitate plasmatică cu consum de trombocite și de factori de coagulare, la care se asociază frecvent și o fibrinoliză secundară. Markerii biologici ai procesului sunt prezența monomerilor de fibrină și a produșilor de degradare ai fibrinei în serul bolnavului. Testele globale de coagulare sunt adesea alterate. Diagnosticul de PTT se sprijină pe triada anemie hemolitică cu eritrocite fragmentate, trombocitopenie și semne de suferință neurologică, la care se asociază, inconstant, febră și/sau insuficiență renală. Probele globale de coagulare rămân, în general, nealterate, iar în arteriole și capilare se decelează trombi hialini constituiți dintr-un material PAS +.

La bolnavii cu tumori metastazate, AHM se poate asocia cu trombopenie și CID (mai ales în carcinoamele mucosecretante) sau, alteori, cu hiperplachetoză și tablou leucoeritroblastic al formulei sanguine (cancer bronhogenic sau metastaze pulmonare).

În concluzie, existența unei hemolize trebuie suspectată ori de câte ori se asociază hiperbilirubinemia indirectă cu hiperreticulocitoza. Interpretarea corectă a aspectului eritrocitelor de pe frotiul de sânge oferă informații importante pentru orientarea diagnosticului etiopatogenic. Cu excepția eritrocitelor falciforme, care sunt cvasipatognomonice pentru siclemie, tablourile morfologiei eritrocitare sugerează mecanisme diferite. De aceea, diagnosticul morfologic trebuie verificat prin teste primare și teste specifice. Principalele teste primare sunt: testul Coombs, testul de aglutinare la rece, testul de autohemoliză, rezistența osmotică, electroforeza hemoglobinei. Dintre testele specifice menționăm: determinarea enzimelor eritrocitare, determinarea structurii lanțurilor de globină, testul hemolizinelor bifazice, testul Ham. Revenim cu sublinierea că în orice hemoliză trebuie cercetată, confirmată și tratată cauza.

BIBLIOGRAFIE

1. BABIOR B. M., STOSSEL T. P.: Hematology. A pathophysiological approach, Edit. Churchill-Livingstone, New York, 1990, 99.
2. BAIN B. J., CLARK D. M., LAMPERT I. A.: Bone marrow pathology. Blackwell Scientific Publications, Londra, 1992, 209.
3. DACIE J. V., LEWIS S. M.: Practical hematology, Edit. Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1984, 107—144.
4. HARMENING D. M.: Clinical Hematology and fundamentals of hemostasis, F. A. Davis Comp., Philadelphia, 1992, 17.
5. JANDL J. H.: Blood: textbook of hematology, Little Brown Comp., Boston/Toronto, 1987, 89.
6. KJELDSBERG C.: Practical diagnosis of hematologic disorders, Am. Soc. Clin. Path., 1989, Chicago.
7. LA CELLE P. L.: Distruction of erythrocytes. În Williams W. J., Beutler E., Erslev A. J., Lichtman M. A. (eds.): Hematology, McGraw Hill Inc., New York, 1990, 398.
8. OSTROW J. D. şi colab.: J. Clin. Invest, 1962; 41: 1 628.
9. VÂLCU A.: Eritrocitul, Edit. Medicală, Bucureşti, 1977, 368.
10. WINTROBE M. M.: Clinical Hematology, Lea & Febiger, Philadelphia, 1967, 171.

XXVII

ANEMIILE HEMOLITICE PRIN DEFECT DE MEMBRANĂ

AL. VĂLCU

Progresele tehnice, mai ales cele din domeniul biochimiei şi a biofizicii, obţinute în ultimii ani, au permis să se identifice şi chiar să se precizeze (în unele cazuri până la amănunt) alcătuirea şi interdependenţa moleculelor membranei eritrocitare normale, precum şi explicaţia consecinţelor ce se produc în cazurile de abateri de la tiparele lăsate de natură. Morfologia şi plasticitatea eritrocitului sunt legate de anomaliile cantitative şi calitative ale proteinelor scheletale, dar nu numai. Orice anemie hemolitică, indiferent că este hemoglobinopatie (de exemplu siclemia), hemoglobinoză (talasemia) sau enzimopatie (deficit de G_6PD), cât şi cele de cauză extraeritrocitară, se însoţesc de o alterare a membranei eritrocitare care se repercutează asupra eritrocitului reducându-i rezistenţa, elasticitatea şi funcţiile şi, implicit, scăderea duratei lui de viaţă.

Clasificarea anemiilor hemolitice prin defect de membrană. Progresele în cunoaşterea arhitecturii şi conexiunilor dintre componentele membranei eritrocitare obligă la revizuirea modului de înţelegere a acestui grup de anemii hemolitice, astfel încât o clasificare definitivă este încă prematură. De aceea numai o schiţare orientativă a patologiei membranei eritrocitare poate fi prezentată în acest stadiu.

A. Patologia scheletului de membrană (a reţelei interne):
   1. anemii de tip hemolitic cronic: sferocitoza, ovalocitoza şi piropoikilocitoza ereditară;
   2. anemii hemolitice intravasculare (brutale) anicterice: hemoglobinuria de marş.

B. Patologia stratului mediu (lipidic):
   1. tulburări ale structurii stratului lipidic bilaminat: acantocitoza ereditară;

2. tulburări ale componentelor lipoproteinelor integrate în stratul lipidic bilaminat: stomatocitoza și xantocitoza ereditară.

C. Patologia stratului superficial:
1. anomalia ereditară numită boala grupului Rh nul;
2. anemii hemolitice autoimune (dobândite), vezi capitolul respectiv.

PATOLOGIA REȚELEI INTERNE (A SCHELETULUI DE MEMBRANĂ)

Anomaliile stratului intern al membranei eritrocitare, de departe cel mai răspândit ca frecvență, a figurat, până în ultimele decenii, redus aproape exclusiv la sferocitoza și ovalocitoza ereditară. Aceste boli genetice, considerate până de curând omogene, par a fi și ele tot atât de heterogene genetic ca și hemoglobinopatiile și enzimopatiile. După cum s-a văzut la descrierea alcătuirii membranei eritrocitare, stratul intern sau scheletul, pe care este structurată membrana, este alcătuit din împletirea unui mare număr de proteine. Slăbirea rețelei într-un anumit punct duce la un *locus minoris resistentiae* ca un anumit specific patogenetic. Acest strat asigură eritrocitului rezistența, forma, deformabilitatea (flexibilitatea) și integritatea eritrocitară.

SFEROCITOZA EREDITARĂ (SE) (MICROSFEROCITOZA SAU BOALA MINKOWSKI-CHAUFFARD)

Se caracterizează prin anemie hemolitică de tip intraeritrocitar, icter, reticulocitoză crescută și splenomegalie; boala mai prezintă o serie de stigmate eritrocitare caracteristice ca microsferocitoză, scăderea rezistenței eritrocitare la soluții saline hipotone, creșterea hemolizei spontane (care se corectează după adaos de glucoză), precum și sechestrare eritrocitară splenică și răspuns favorabil la splenectomie.

Istoric. Primele descrieri ale SE datează din 1872 (Vanlair și Masius), iar în 1900 Minkowski comunică, cu detalii, 8 cazuri pe 3 generații, arătând caracterul ereditar al transmiterii. Chauffard (1907) arată că eritrocitele prezintă microcitoză și o rezistență scăzută. În 1911, Banti, Eppinger ș.a. au efectuat, la sugestia lui Micheli, primele splenectomii cu rezultate favorabile.

Incidență. Boala este întâlnită pe toate continentele, la toate rasele și la ambele sexe. Există o predominanță la rasa albă, mai ales la popoarele din nordul Europei. Este mai rară la negrii din Africa sau America. Unele statistici o estimează la circa 200—300 de cazuri la un milion de locuitori, adică un caz la 5 000 de locuitori (10, 24). Urmare acestei evaluări ar rezulta o prezență de aproximativ 4—5 000 de cazuri în România. În țara noastră a fost considerată ca boala hemolitică de tip intraeritrocitar cu cea mai mare răspândire. În urma descoperirii formelor clinice de talasemie minimă (asimptomatice), depistate în familiile cu forme patente de talasemie, frecvența sferocitozei ereditare a trecut pe locul secund.

Etiopatogenie. În prezent se acceptă că în 75% din familii, modul de transmitere genetică în SE se face după modelul mendelian autosomal dominant. În celelalte 25% modul de transmitere este nedominant, probabil recesiv. În prima incidență ea se moștenește de la unul din părinți, independent de sex, persoanele afectate fiind heterozigote pentru tară, dar în practică, maladia nu se întâlnește decât la maximum 25% (4:1) dintre descendenți sau chiar mai puțin. Existența formelor homozigote, excluse până de curând, trebuie admisă, cel puțin pentru acele cazuri care se caracterizează prin sferoditoză periferică de 100% cu fragmentare spontană a eritrocitelor etc. În aproape 25% din cazuri SE nu a fost întâlnită la nici unul din părinți. Acest fapt a fost explicat fie prin apariția unor mutații spontane (eventualitate ce poate fi acceptată doar pentru un număr foarte redus de cazuri), fie prin paternitate nelegitimă, fie prin atenuarea expresivității genei la anumiți purtători, fapt ce nu poate fi exclus cunoscând că, în aceeași fratrie, există cazuri cu expresie clinică severă alături de cazuri descoperite la o vârstă înaintată sau având o simptomatologie foarte atenuată (cu gene silențioase). Toate aceste constatări duc la concluzia că bolile ereditare ale membranei eritrocitare nu sunt atât de omogene pe cât s-a considerat și că, și în acest domeniu, ca și în hemoglobinopatii și enzimopatii, există o mare heterogenitate. Soliditatea și elasticitatea scheletului membranei sunt răspunzătoare de interacțiunea tuturor proteinelor structurale, o perturbare a legăturii dintre ele ducând la o instabilitate și scădere a rezistenței eritrocitare. Defectul principal constă într-o instabilitate funcțională a membranei la nivel scheletal, spectrina (dar nu numai ea) având rolul cheie, fiind, direct sau indirect, implicată.

Baza moleculară a acestui sindrom este, și aici, foarte heterogenă și se află încă la începutul „descifrărilor". În prezent se fac cercetări pentru stabilirea cu exactitate a defectelor moleculare: proteina deficitară, monomerul afectat, poziția și tipul acidului aminat înlocuit, precum și asocierea cu alte proteine deficiente și consecințele fiziopatologice și clinice ale acestor perturbări. Au fost găsite mutații la nivelul lanțului α al spectrinei, dar mai ales al lanțului β deși nu este încă lămurit dacă defectul principal rezidă numai la acest nivel sau aici ar fi numai un polimorfism de linkaj. În general, pacienții cu SE, cu mod de transmitere dominant, au un deficit în conținutul de spectrină de 30—50% față de normal și o hemoliză moderată, pe când cei cu mod de transmitere recesiv prezintă un deficit de spectrină de 75—90%, necesitând transfuzii repetate pentru a fi menținuți în viață (24). În unele familii, fără nici o legătură sanguină, s-a găsit prezența unor spectrine instabile cărora le lipsea capacitatea de a lega proteina 4.1 și, în consecință, se legau slab de actină. S-au descris și forme recesive de SE asociate și cu absența proteinei 4.2 și forme dominante cu deficit parțial al proteinei 3. Mai recent au fost comunicate defecte ale anchirinei ce prezentau forme clinice severe și atipice. Alte studii sugerează că defectele localizate pe anchirină ar fi cele mai comune trăsături, mai ales în formele cu transmitere dominantă (21, 30).

După unii autori, deficiența de anchirină reprezintă defectul molecular primar, ea fiind datorită unei încorporări mai reduse în membrana

eritrocitară care are ca efect diminuarea depunerii de spectrină în membrană, cu toate că sinteza de spectrină poate fi normală sau chiar crescută.

Eritrocitele subiecților tarați sau bolnavi se fragmentează mai ușor decât la normali și pierd material structural în cursul circulației eritrocitare (deși când părăsesc măduva par a fi integre), fapt dovedit prin scăderea fosfolipidelor și a colesterolului cu circa 15—20% (13). După un anumit număr de zile de circulație sanguină, în care se pierd fragmente de membrană, ele își accentuează defectul structural și, după ce se depășește o limită a raportului suprafață/volum, devin mai sferice și mai puțin flexibile. Prin structura ei anatomică splina triază din circulație eritrocitele cu defecte, ce nu rezistă mediului inadecvat din sinusurile splenice; stagnarea în „recipientele" pulpei roșii cu o ambianță acidă, hipoglicemică, cu pompa de Na încetinită și cu hemoconcentrație crescută, cât mai ales trecerea eritrocitelor prin cordoanele Billroth cu fenestrații înguste (circa 2—3 μ), fac ca eritrocitele cu flexibilitate redusă să rămână sechestrate *in situ* și să fie fagocitate de macrofagele splenice aflate în număr mare în pulpa roșie. Efectul salutar al splenectomiei se datorează faptului că eritrocitele cu aceste defecte nu mai sunt supuse selecției riguroase a calității, ele continuându-și funcția transportoare de oxigen (un număr suplimentar de zile) până când defectul lor ereditar se accentuează și mai mult, nerezistând nici altor selecții, mai puțin riguroase, de exemplu la pasajul mai lax din sinusurile măduvei osoase, hepatice etc., când sunt captate de către macrofagele din aceste teritorii.

O altă observație veche cunoscută în SE este perturbarea importantă a schimburilor cationice prin membrană. Prezența de ATP asigură expulzarea activă a Na din eritrocit, însă în SE anomalia membranei duce la pătrunderea pasivă a Na și apei în interiorul eritrocitului cu dispariția zonelor concave din mijlocul discului și tendința celulei de a lua o formă sferică. (vezi și „pompa ionică" la cap. Eritronul.)

Tablou clinic. Boala, deși ereditară, este rar descoperită curând după naștere sau în prima copilărie; este semnalată mai ales în perioada preșcolară sau școlară sau în adolescență. Sunt descrise și situații în care tabloul caracteristic a apărut abia la 75 de ani și chiar după 80 de ani, ceea ce dovedește existența unor forme clinice cu o bună compensare pentru o foarte lungă perioadă de timp. Boala poate fi recunoscută mult mai de timpuriu dacă se efectuează investigații familiale atente, căutându-se și existența cazurilor fruste. În unele forme, cu evoluție severă ulterioară, mamele au constatat prezența tarei încă în primele luni de viață, cu ocazia îmbăierii copilului, simțind în palmă o splină mărită (observație personală). Mai frecvente sunt unele semne din perioada neonatală când acestea se pot confunda cu simptomatologia acestei vârste. De exemplu icterul neonatal apare cu o frecvență și intensitate mult mai mare decât la nou-născuții fără această tară.

În general, vârsta apariției primelor semne de boală se corelează cu severitatea semnelor clinice. Tulburările de dezvoltare somatopsihică pot fi prezente în grade variabile, dar sunt incomparabil mai atenuate decât cele din talasemiile homozigote. Bolnavii rămân uneori cu un aspect infantil, iar pubertatea poate fi întârziată (dezvoltare staturo-ponderală de-

ficitară cu dezvoltare genitală slabă). Distrofia craniofacială, descrisă ca patognomonică în talasemia homozigotă, poate lipsi sau este discretă.

Paliditatea tegumentelor și colorația icterică sunt două semne care adesea alternează sau se intrică. *Paliditatea* nu este prea accentuată din cauza capacității mari de compensare a măduvei cu funcție eficientă. Anemiile severe formează excepții. *Icterul* sau subicterul este prezent în 2/3 din cazuri la adulți și 1/2 la copii. El poate fi localizat la conjunctive sau poate fi generalizat. Bolnavii suportă bine acest icter care poate persista toată viața; unii din ei sunt capabili chiar de munci fizice susținute, fiind „mai mult icterici decât bolnavi". În majoritatea cazurilor, icterul se manifestă intermitent, mai pronunțat în boli intercurente, după eforturi fizice, oboseli, expunere la rece, stresuri, sarcină etc., intensitatea lui fiind dependentă și de capacitatea funcțională a ficatului. Icterul este produs de creșterea bilirubinei libere (indirecte) rezultată din hemoliza sporită a eritrocitelor și nu este însoțit de retenție de săruri biliare (icter acolor).

Splenomegalia, variabilă ca dimensiuni, este al treilea simptom cardinal al bolii. În general, ea nu este sensibilă la palpare. Deși poate fi constatată încă din primul an de la naștere, ea crește treptat ajungând la dimensiunile maxime la vârsta adultă. Deși splenomegalia este o consecință a unei hiperactivități hemolitice, nu există o corelație absolută între dimensiunea ei și starea clinică. Splenomegaliile gigante, incomparabil mai rare decât în talasemia homozigotă, pot provoca tulburări de compresiune și, uneori, perisplenite dureroase care pot duce la simfize întinse cu regiunile învecinate. În aceste cazuri este mai frecventă asocierea cu hipersplenismul, contribuind defavorabil la accentuarea anemiei și a icterului.

Ulcerațiile cronice ale gambelor cu localizare mai ales la extremitatea lor distală, mono- sau bilateral, apar în aproape 1/3 din cazuri. Ele pot persista luni și chiar ani; vindecarea lasă zone de hiperpigmentare alternând cu zone sidefii. Traumatismele, fie ele și mici, favorizează apariția ulcerațiilor. Prezența acestor tulburări trofice constituie un indiciu valoros de anemie hemolitică intraeritrocitară. Uneori pot apărea dureri în regiunea colecistului, corelate cu prezența unei litiaze pigmentare.

Examene de laborator. *Numărul de eritrocite* este moderat redus; în general se întâlnesc valori cuprinse între 3 și 4 milioane/mm^3, cu Hb redusă corespunzător (anemie de tip normocrom). Anemia este mai pronunțată la copii, fără a fi însă severă (8—10 g Hb/100 ml), iar când aceștia ajung la maturitate, anemia diminuează în intensitate, depășind 10 g Hb/100 ml. După stările de deglobulizare induse prin crize aplastice, numărul de eritrocite, Hb și Ht pot scădea considerabil. Examenul atent al morfologiei eritrocitare este de primă importanță pentru diagnosticul de SE. Patognomonică este constatarea *microsferocitelor* pe frotiul sanguin. Ele se realizează prin scăderea diametrului eritrocitar mediu și creșterea grosimii eritrocitare medii, ceea ce face ca eritrocitele să apară mai mici, mai intens colorate și cu dispariția zonei mai clare din centrul lor, comparabile unor sfere colorate omogen. Procentul microsferocitelor este variabil de la un bolnav la altul; el oscilează între 20 și 25% și poate ajunge, excepțional, până la 90%. Este descrisă și o boală genetică, cu

transmitere recesivă, cu prezența sferocitelor în proporție de 100%. De multe ori procentul redus de microsferocite, uneori chiar până la 5%, scapă din vedere chiar și unui observator experimentat. Situațiile cu număr redus de sferocite îndreptățesc părerea unor autori care susțin că, în astfel de cazuri, denumirea de sferocitoză nu este justificată. În aceste cazuri, testul cu eritrocite neincubate, pentru depistarea fragilității osmotice, este nerelevant. Testul cu eritrocite puse în incubator evidențiază mai bine anomalia. Frotiurile sanguine incorect întinse ar putea apărea, pentru un ochi neexperimentat, ca bogate în sferocite, acestea fiind însă artefacte de întindere, prezente alături de eritrocitele crenelate. În acest caz este necesar să se caute pe frotiu zone în care eritrocitele sunt întinse în strat subțire și unde apar perfect rotunde, majoritatea având zona centrală mai palidă.

Reticulocitoza este constant prezentă cu excepția stărilor de criză aplastică; în mod obișnuit se întâlnesc valori de 8—25%. O reticulocitoză de peste 8% este un semn de laborator mai constant și mai fidel decât hiperbilirubinemia care poate lipsi în 30—40% din cazuri. Creșteri ale reticulocitelor de peste 50% și mai mult se întâlnesc după crizele de deglobulizare prin hemoliză.

Pe frotiu se mai constată și prezența altor semne de regenerare eritrocitară, ca policromatofilia, prezența de resturi nucleare intraeritrocitare (corpi Howel-Jolly), apariția de eritroblaști, toate necaracteristice pentru SE înainte de splenectomie. Curba Price-Jones prezintă, în general, două vârfuri: unul situat la stânga diametrului eritrocitar mediu (populație microsferocitară), iar al doilea la dreapta (prezența reticulocitelor).

Seriile leucotrombocitare sunt puțin modificate în perioada de stare.

Mielograma pune în evidență o măduvă cu celularitate bogată. Raportul granulocite/eritroblaști indică o hiperplazie normoblastică. Curba de maturare pe toate seriile este normală. Eritropoieza ineficientă nu este prezentă în SE; hemoliza este de tip periferic, formarea microsferocitelor având loc abia în sângele periferic. Puncția medulară efectuată la începutul crizei aplastice pune în evidență o scădere drastică a precursorilor eritrocitari, realizând un tablou de eritroblastopenie acută.

Rezistența osmotică: fragilitatea crescută a eritrocitelor se traduce prin scăderea rezistenței osmotice în soluții hipotone care este testul de rutină, folosit și pentru triere în SE. La o evaluare cu ochiul liber, hemoliza începe, la normali, la o concentrație de NaCl de 0,45% și este totală la 0,35%; la determinări fotometrice, hemoliza începe la 0,52% (hemoliza 1%) și se încheie la 0,3%. În sferocitoză, rezistența osmotică este pronunțat scăzută; ea începe de la valori apropiate de ale serului fiziologic (de exemplu la 0,8%) și se termină la aproximativ 0,4%. Întrucât testul clasic apare adesea insuficient de sensibil pentru diagnostic (circa 25% din cazuri arătând o rezistență osmotică normală), s-a generalizat determinarea acesteia după incubarea simplă sau cu adaos de glucoză, imitându-se astfel condițiile din sinusurile splenice. Aceasta constă în determinarea rezistenței osmotice după o conservare a eritrocitelor, timp de 24 de ore la 37°C, limitele situându-se între 0,75 și 0,15% NaCl. Totuși, nici prin acest test nu s-a putut identifica, în toate cazurile, purtătorii, clinic sănătoși, ai tarei (24).

Rezistența mecanică a eritrocitelor, fără să fie un test de rutină, este și ea scăzută, însă nu la nivelul valorilor întâlnite în talasemiile homozigote. Fragilitatea mecanică crescută se explică prin faptul că eritrocitele tarate, având un defect de membrană, pierd continuu, în timpul circulației sanguine, fragmente de membrană, devenind cu timpul, sferice și lipsite de elasticitate.

Atât rezistența osmotică, cât și cea mecanică nu dispar după splenectomie.

Testul de autohemoliză (după Selwyn și Dacie). Eritrocitele recoltate steril și menținute în plasma proprie la termostat, la 37°C timp de 48 de ore, se hemolizează mai intens decât cele normale. Această hemoliză se corectează prin adaos de glucoză la mediul de incubare. Testul este foarte sensibil, dar, în anumite laboratoare, oferă rezultate fals pozitive, de aceea este utilă verificarea testului atât în cazurile de SE care se corectează la glucoză, cât și în alte hemolize cronice cu acest test pozitiv, dar care nu se corectează la glucoză (anemia hemolitică autoimună, enzimopatii eritrocitare etc.).

Hemoliza: bilirubinemia este în general crescută, predominând fracțiunea liberă neconjugată, până la 3—4 mg/100 ml. La o creștere persistentă de peste 5 mg/100 ml, trebuie suspectată o leziune hepatică concomitentă. Ficatul având o capacitate de glucuronare de circa 10 ori mai mare decât conjugarea fiziologică, creșterea bilirubinei serice este urmată de o creștere proporțională a excreției biliare. Bilirubina conjugată crește doar puțin reprezentând circa 15% din bilirubina totală (36). În cursul crizelor aplastice, bilirubina este scăzută.

Hemoglobinemia este absentă sau foarte puțin crescută; haptoglobina serică este absentă sau numai slab evidențiabilă (test de mare sensibilitate la adult). Tot ca semn al hiperhemolizei este și creșterea activității lactat-dehidrogenazei serice (LDH). Aceste determinări sunt însă rareori necesare pentru diagnostic.

Testele cu radioizotopi arată o durată de viață scăzută a eritrocitelor (în medie 20—30 de zile) și o sechestrare splenică accentuată. Studiul metabolismului fierului cu ^{59}Fe relevă o apariție scurtă și în cantitate mică a ^{59}Fe în măduvă și o prezență crescută a acestuia în splină și mai puțin în ficat.

Urina este de culoare brun-roșcată și conține urobilinogen și mai ales urobilină în cantități crescute (icter urobilinuric); sărurile biliare sunt absente din urină. Fecalele sunt intens colorate, excreția de stercobilinogen fiind considerabil crescută.

Sideremia este variabilă dar, cel mai des, nivelul fierului seric este moderat crescut.

Evoluție, complicații. Boala evoluează cronic cu ameliorări și agravări în decursul anilor. Elementul esențial în evoluția bolii este menținerea sau alterarea echilibrului dintre hiperhemoliza eritrocitelor circulante și regenerarea eritrocitară în exces. În urma acestor oscilații, atât anemia, cât și icterul pot dispărea sau se pot accentua. Când ambele dispar clinic, doar splenomegalia rămâne mărturie pentru existența bolii și eventual tulburările trofice ale gambelor, în cazul în care s-au produs ulcerații.

Complicații hepatobiliare se observă mai ales la persoanele de vârstă medie, fără să fie rare nici la copii; astfel 50% din copiii sub 10 ani pre-

zintă litiază biliară. La adulții tineri, afectarea vezicii biliare se constată în 50% din cazuri și se traduce printr-o colecistită simplă, dar cel mai frecvent printr-o *colecistită calculoasă*, cu calculi pigmentari mici, formați din bilirubinat de calciu. Se apreciază că 50—70% din bolnavi fac în cursul evoluției o litiază pigmentară, dar numai 50% sunt opace la ecografie. Litiaza se poate complica cu colici hepatice și cu fenomene de angiocolită. În urma suprasolicitărilor hepatice, pentru conjugarea bilirubinei indirecte timp de decenii, se poate ajunge la o suferință hepatică, astfel că icterului hemolitic i se poate adăuga un icttr hepatic, realizându-se un icter mixt. Uneori apare și o componentă colestatică (prin trombuși biliari, stază biliară sau calculi pigmentari). În icterul hepatic și prin colestază apare și creșterea bilirubinei directe (conjugate).

Alte complicații, deși rare, sunt posibile. Spectrina și ankirina nu reprezintă exclusiv apanajul eritrocitelor, ci pot să intereseze și neuronii (mai ales pe cei din cerebel), miocitele cardiace și cele scheletale. Sunt lucrări care semnalează disfuncții ale măduvei spinale ce se manifestă aproape asemănător cu sclerozele, precum și cardiopatii familiale (24).

Crizele în sferocitoza ereditară și bolile înrudite. Acestea nu lipsesc, practic, de la nici un pacient. Ele se manifestă printr-o înrăutățire, mai blândă sau extrem de gravă, a evoluției bolii și, din punct de vedere patogenetic, sunt de trei tipuri: crize hemolitice, crize aplastice și crize megaloblastice.

1) *Crizele hemolitice sau de deglobulizare* pot apărea pe parcursul evoluției sub formă de agravări (uneori cu caracter acut) a stării clinice, cu o gamă largă de manifestări, de la simple „indispoziții" (cele mai frecvente) până la stări de gravitate extremă (crizele de deglobulizare). Ele par a fi provocate de hiperplazia SRH ce însoțește unele infecții.

Crizele hemolitice sunt frecvente și benigne, variind ca intensitate de la crize minore care imită o stare gripală până la crize majore, asemănătoare cu criza hemolitică dintr-un deficit de G6-PD. Bolnavii acuză o stare de „rău general", tahicardie, cefalee, fenomene dispeptice nespecifice, mialgii, frisonete, stări subfebrile, accentuarea icterului, eliminarea de urini hipercrome și creșterea rapidă de volum a splinei. Examenele de laborator indică o creștere a bilirubinei indirecte și a reticulocitozei sanguine, iar medulograma relevă o intensificare a eritropoiezei cu predominanța precursorilor eritrocitari aflați într-un stadiu avansat de maturare. Crizele hemolitice au o durată relativ scurtă; în formele medii nu depășesc 3—5 zile.

2) *Crizele aplastice* sunt mult mai rare, dar mai dramatice ca manifestări clinice. Ele se traduc printr-o stare de „rău general" care poate merge până la prostrație, dureri vii abdominale, greață, vărsături, febră până la 39—40°C, paloare și, în cazuri grave, colaps și comă, necesitând spitalizare de urgență și aplicarea de transfuzii masive, fără de care evoluția poate fi letală. Examenele de laborator relevă o scădere a nivelului obișnuit al hemoglobinei, hematocritului și a reticulocitozei, iar în medulogramă o reducere până la dispariție a eritroblaștilor. Se constată o scădere a bilirubinei (urmare a scăderi eritropoiezei), precum și a sideremiei (prin lipsa utilizării fierului la nivelul măduvei). Medicul este tentat să interpreteze favorabil diminuarea icterului, iar reapariția lui

ca un semn nefavorabil, deşi aceasta reprezintă o revenire la normalizare a eritropoiezei, alături de reapariţia reticulocitozei, a leucocitozei şi trombocitozei şi de diminuarea sideremiei. Aceste fenomene severe revin la normal în 10—15 zile şi necesită intervenţie medicală neîntârziată, precum şi ţinerea sub observaţie a bolnavului o perioadă de timp.

Crizele de deglobulizare de tip hemolitic sunt declanşate de cauzele cele mai variate: infecţii, excese de alcool, eforturi fizice, sarcină, lăuzie, menstre. Uneori excese alimentare, traume psihice sau chiar influenţe meteorologice pot favoriza astfel de crize. Deseori nu se poate invoca nici o cauză aparentă în declanşarea lor.

Crizele de tip aplastic par să fie provocate (chiar dacă nu în exclusivitate) de dezvoltarea de parvovirus B_{19}, capabil să producă (ca şi în alte cazuri) fenomene de eritroblastopenie. După o incubaţie de 10 zile se instalează un sindrom anemic profund cu scăderea brutală a Hb până la valori de 2—3 g/100 ml, însoţit de semne de infecţie (frison, febră, cefalee, greaţă, dureri abdominale etc.). Infecţia cu parvovirus este contagioasă şi reprezintă un pericol nu numai pentru mamă şi făt, de aceea femeile gravide vor fi izolate de bolnavii din familie predispuşi să repete astfel de crize (21, 24). În crizele aplastice nivelul reticulocitelor scade, iar anemia nu se limitează numai la seria roşie, ci este însoţită şi de leuco- şi trombocitopenie.

Durata crizei este de 7—10 zile, fiind urmată de o hiperreticulocitoză însoţită de hiperleuco- şi trombocitoză, iar hipoplazia eritroblastică de hiperplazia seriei roşii. În unele cazuri crizele au fost revelatoare pentru boală (20).

3) *Crizele megaloblastice* apar în cazurile în care aportul de folaţi este necorespunzător. Consumul de folaţi este crescut în toate formele de anemii hemolitice, mai ales în acelea în care hiperplazia eritroidă este mare şi constantă, cu măduvă „eficientă". În cazurile de sarcină avansată, când consumul de folaţi este mai mare, el trebuie să fie suplimentat cu 1 mg de acid folic pe zi, mai ales în lunile decembrie-aprilie când concentraţia lui scade din alimentaţia curentă. În general, aceste crize însoţesc stările în care apar şi crizele de tip hemolitic.

Forme clinice. Formele clinice fruste şi inaparente sunt numeroase (20—30%) şi corespund unor manifestări clinice şi de laborator atât de discrete, încât atât subiecţii cât şi medicii ignoră existenţa unei suferinţe ereditare. Formele clinice complet compensate explică de ce aproape toate *pedigree*-urile descrise în literatură arată îmbolnăviri mai reduse decât jumătate din membrii familiilor afectate. În formele moderate pot să lipsească înseşi semnele cardinale, clinice şi de laborator, ale bolii. Au fost descrise forme fără anemie (chiar cu tendinţă uşoară la poliglobulie), fără icter şi fără splenomegalie decelabilă şi doar existenţa unor semne discrete de hemoliză. De asemenea, fragilitatea osmotică a eritrocitelor neincubate poate lipsi, iar sferocitoza poate fi discretă. În aceste forme, numai urmărirea amănunţită, în timp, a membrilor de familie poate permite depistarea deţinătorilor de tară.

Formele clinice incomplete se prezintă sub mai multe aspecte. *Formele anemice* îmbracă simptomatologia unei anemii cronice moderate cu splenomegalie discretă; alteori splenomegalia nu este decelată nici la pal-

pare și nici scintigrafic. *Forma de anemie febrilă acută* corespunde crizelor de deglobulizare de intensitate redusă. *Forma icterică*, neînsoțită de anemie, este relativ frecvent întâlnită, bolnavii fiind adesea capabili de munci grele, cu toată prezența icterului care poate fi uneori foarte pronunțat. Absența anemiei se datorează activității hiperregenerative care poate atinge 800%. *Forma splenomegalică* nu se însoțește de nici un simptom clinic, în afară de splenomegalie. Aceste forme incomplete sunt mai frecvente în copilărie când reprezintă circa jumătate din cazurile aparente de boală. Ele se pot complica cu accidente grave, ca și formele cu simptomatologie completă.

Forme clinice severe care, de asemenea, sunt variabile. *Forme neonatale*, care cuprind circa 20% dintre copiii născuți cu SE, prezentând la naștere un icter a cărui intensitate depășește evoluția icterului fiziologic neonatal, greu de diferențiat de alte tipuri de ictere severe din această perioadă. *Forme cu evoluție severă*, care cuprind un procent scăzut de cazuri (circa 5%) cu evoluție gravă încât din primii ani ai copilăriei viața lor devine dependentă de transfuziile de sânge; ei pot fi confundați, din punct de vedere staturoponderal și craniofacial, cu formele homozigote de talasemie. La această simptomatologie se adaugă frecvența și gravitatea crizelor de deglobulizare, anemie pronunțată cu icter sever, frecvența litiazei biliare și o splenomegalie ce depășește linia ombilicală. Splenectomia efectuată înainte de instalarea deficiențelor fizice ireversibile, ameliorează evident evoluția infaustă a acestor bolnavi (37).

Profilaxia. În primul rând trebuie amintit „sfatul genetic". Recomandările profilactice făcute în astfel de cazuri, ca și în multe boli ereditare, sunt necesare atât pe plan social, cât și familial. Odată descoperit un caz de SE, este obligatorie investigarea amănunțită a membrilor consanguin. Nu este de dorit să se descopere cazuri patente clinic la o vârstă înaintată, în timp ce se cunoșteau alte cazuri tipice în aceeași familie.

Tratament. Splenectomia este unica măsură de ameliorare ale cărei consecințe benefice pot merge până aproape de normalizarea clinică. Dintre toate, cel mai evident fenomen și mai îmbucurător pentru bolnav, este dispariția icterului și, prin aceasta, se modifică și starea lui psihică față de cei din jur care nu-l mai suspectează și nu se feresc de el de teamă că ar fi contagios. Heilmeyer și Busch citează un caz care își serba, în fiecare an, ziua splenectomiei, ca pe a doua lui zi de naștere, deoarece abia din acea zi a simțit ce înseamnă să trăiască (13). Cu excepția unor cazuri cu simptomatologie discretă, splenectomia trebuie indicată tuturor bolnavilor cu SE. Efectele favorabile ale splenectomiei apar, în majoritatea cazurilor, încă din primele zile de la operație.

Sângele pompat de inimă traversează splina în circa 30 de secunde. Ea primește, cu fiecare bătaie, 5% din sângele circulant sau 300 ml de sânge pe minut. Un eritrocit normal traversează splina de 120 de ori pe zi, însă eritrocitele cu defecte structurale și morfologice, sau eritrocitele de care s-au atașat anticorpi sau sunt parazitate, stagnează în splină minute sau ore sau, odată intrate, nu mai sunt capabile să se strecoare prin cordoanele Billroth. De aceea atribuirea de „controlor de calitate" pentru acest organ (ce nu reprezintă mai mult de 2% din greutatea corporală) se

potrivește ca termen de comparație. Îndepărtarea acesteia permite ca eritrocitele defecte să-și mai poată duce zilele, în circulația sanguină, iar ca recompensă pentru această toleranță, ele își aduc aportul lor de transportoare de oxigen (chiar dacă o fac cu un randament mai scăzut) încă un număr semnificativ de zile. Acest aport este însă de mare ajutor pentru funcția eritroformatoare a măduvei care, prin aportul acestor eritrocite bolnave, este ușurată în a furniza surplusul de eritrocite tinere. Cercetări bazate pe marcarea eritrocitelor cu izotopi radioactivi demonstrează, după splenectomie, o prelungire a duratei de viață a eritrocitelor, deși defectul intracorpuscular nu se corectează. Din această cauză, defectul eritrocitar (sferocitoză, scăderea rezistenței osmotice etc.) persistă și după splenectomie, pe când modificările clinice și biologice, care sunt expresia distrucției eritrocitare crescute, prezintă o ameliorare considerabilă (starea generală, dezvoltarea somatopsihică, crizele de deglobulizare, bilirubinemia, excreția de urobilină, riscul litiazei biliare etc.). După ablația splinei apare o creștere a numărului de siderocite (circa 10%), a poikilocitelor, a corpilor Jolly, a acantocitelor, precum și a leucocitelor și trombocitelor, urmare dispariției unor funcții splenice fiziologice.

Momentul splenectomiei la adult nu va fi ales în cursul crizei de deglobulizare, întrucât evoluția crizei este puțin influențată de splenectomie. Riscul operator la adult este redus; mortalitatea postoperatorie este mult sub 1% (circa 0,2%). Intervenția este cu atât mai ușoară cu cât volumul splinei este mai mic; splinele mari creează adesea dificultăți tehnice de extirpare din cauza proceselor de perisplenită, cu aderențe la organele învecinate. O parte din cazurile cu sfârșit letal la adult au fost provocate de trombozele prin hiperplachetoză în teritoriul venei porte sau al venei cave (13).

Momentul splenectomiei la copil este bine să fie ales după vârsta de 6—7 ani, mai ales în cazurile cu forme clinice medii și când dezvoltarea somatică nu prezintă riscul instalării unor defecte fizice ireversibile. În cazurile de gravitate majoră, în care anemia, icterul, instalarea litiazei biliare și crizele severe de deglobulizare pun în primejdie viața copilului, riscurile splenectomiei trebuie cântărite în comparație cu beneficiile după splenectomie. Este totuși preferabil ca în acest interval de vârste să se prefere transfuziile. Efectuată înaintea vârstei de 3 ani, dar mai ales în primele 6 luni de viață, splenectomia predispune frecvent la infecții cu evoluție severă și este urmată, în proporție de 50%, de decese. Complicațiile infecțioase ar putea fi reduse simțitor prin imunizarea pacientului cu vaccin pneumococic, întrucât 50% din infecțiile după splenectomie sunt date de pneumococ. Cealaltă jumătate a complicațiilor septice este repartizată, în proporții aproximativ egale, între *N. meningitidis, E. coli, H. influenzae, S. aureaus* și *Streptococcus*. Terapia profilactică cu antibiotice este incertă, datorită mai ales tulpinilor de pneumococ rezistente la penicilină.

Copiii splenectomizați trebuie supravegheați îndeaproape și, la primul semn de febricitare, tratați cu penicilină, în doze mari, asociată cu un alt antibiotic, de tip Amoxacilin sau cu Cotrimoxazol (Biseptol), dar este de preferat vaccinul polivalent de pneumococi.

Splenectomia trebuie precedată de o explorare radiologică a căilor biliare în care adeseori sunt întâlniți calculi. În cursul splenectomiei este important ca chirurgul să caute amănunțit și să facă exereza splinelor accesorii, uneori mici, dar nu rare (20—30%), cărora li se impută unele din insuccesele splenectomiei; absența corpilor Howell-Jolly și a reticulocitelor de pe frotiul sanguin, precum și reapariția icterului pledează în favoarea acestei eventualități care poate apărea după ani sau chiar decenii de la splenectomie (24).

În afara splenectomiei nu există alte posibilități terapeutice de fond. În cursul crizelor de deglobulizare, în care anemia, instalată brusc, pune în primejdie viața bolnavilor, *transfuziile* sunt obligatorii. Aplicarea lor promptă a scăzut substanțial numărul de decese semnalate înainte ca acest procedeu terapeutic să fie la îndemâna oricărui dispensar. De reținut că serul de convalescent de la bolnavi, care au suferit de infecții cu *parvovirus* B_{19}, conține anticorpi specifici și poate fi aplicat acolo unde este disponibil (20).

Administrarea de acid folic, câte 1 mg pe zi, este necesară pentru a susține eritropoieza și evitarea crizelor megaloblastice mai ales în lunile de iarnă-primăvară (decembrie-aprilie), când scad în activitate din fructele și zarzavaturile în care se găsesc din abundență.

Colagogele și colereticele sunt indicate pentru a drena căile biliare și a reduce incidența litiazei biliare pigmentare.

Administrarea de hormoni (corticoizi, androgeni), de fier, microelemente etc. este în general lipsită de sens.

OVALOCITOZA SAU ELIPTOCITOZA EREDITARĂ

Ovalocitoza ereditară (OE) reprezintă un grup foarte heterogen de dezordini ale structurii membranei eritrocitare, caracterizată morfologic prin prezența unui procent crescut de eritrocite ovale în sângele periferic însoțită, uneori, de anemie de tip hemolitic.

Filogenetic, ovalocitele sunt premergătoare eritrocitelor. Vertebratele inferioare (cu excepția unor batracieni), reptilele și păsările, precum și unele mamifere, cum sunt cele din familia camelidelor (cămila, dromaderul și lama) au în sângele lor circulant exclusiv ovalocite. La oamenii normali există o ovalocitoză fiziologică ce nu depășește 10—15%, iar diferența dintre cele două diametre nu este mai mare de 1—2 μ. În unele cazuri patologice, ovalocitoza este mult mai pronunțată, ca de exemplu în anemia megaloblastică care, pe lângă caracterul megalocitar, prezintă și ovalocitoză, ambele aspecte dispărând după tratament.

Istoric. OE a fost descrisă pentru prima dată de Deesvach în 1904, la un mulatru de 22 de ani. Bishop, în 1914, descrie caracterul familial, iar Wyandt, în 1941, face referiri la 246 de cazuri descrise în literatură, reprezentate pe 64 de familii. De atunci cazurile publicate au devenit frecvente, descriindu-se și numeroase forme clinice.

Frecvența ei este apropiată de a sferocitozei ereditare, dar curba manifestărilor clinice, de la formele total asimptomatice la cele foarte severe fiind mult mai aplatizată, explică apariția ei mai redusă în descrierile autorilor.

Patogenie. Boala este ereditară și se transmite atât ca un caracter autosomal dominant, cât și ca unul recesiv. OE, ca și sferocitoza, au fost considerate ca fiind date de o genă cu caracter dominant, transmisă de unul din părinți. În cazul acesta transmiterea bolii ar trebui să fie, teoretic, de circa 50%. Cu toate acestea, se întâlnesc cazuri când ambii părinți sunt aparent sănătoși, deși unul sau mai mulți copii prezintă grade variate de manifestări fenotipice. Aceasta nu se mai explică prnitr-o „penetranță scăzută", ci prin caracterul recesiv al transmiterii, de unde rezultă și expresivitatea diferită a maladiei. În afara formelor de OE în care elementul specific pe frotiul sanguin este ovalocitoza, s-au descris variante cu aspect de piropoikilocitoză, cu marcată hemoliză. Sângele periferic al unor subiecți din unele fratrii prezentau microcitoză, picnocitoză, eritrocite înmugurite și tendință la fragmentare. Cercetându-se comportamentul părinților, s-a putut constata că ambii părinți, sau numai unul, aveau ușoare forme de OE. Comportamentul fraților apărea și mai heterogen: de la formele total asimptomatice, până la formele de mare severitate (vezi și Piropoikilocitoza).

Ca și în cazul hemoglobinopatiilor, unde numărul entităților morbide se reducea, în urmă cu câteva decenii, la circa o jumătate de duzină, pentru ca astăzi să depășească cifra de 300, se pare că și în cazul patologiei scheletului de membrană, să se modifice concepția patogenetică. Este adevărat că din sutele de hemoglobinopatii doar 4 reprezintă peste 95% din totalul lor pe terra (altele fiind descrise în număr redus sau doar ca unicate sau sunt întâlnite în cadrul unei singure familii) dar, ca varietate genotipică, fiecare a îmbogățit lista variantelor, cu sau fără expresie fenotipică. După cum în cazul hemoglobinopatiilor este acum necesară precizarea biochimică a abaterii de la structura normală a tipului de acid aminat pe lanțul peptidic, cu indicarea orașului sau a laboratorului în care s-a realizat descoperirea, la fel au început să fie necesare aceste precizări și pentru patologia structurii scheletale. De exemplu, eliptocitoza Barcelona la care mutația a fost localizată pe lanțul $\alpha I^{50-469 his \rightarrow pro}$ (37).

Atât în cazul OE cât și în cel al altor anemii hemolitice înrudite (SE, PPE) pot fi incriminați mai mulți factori patogenetici: deficit cantitativ de spectrină, variate tipuri de spectrină disfuncțională, defecțiuni ale proteinei de legătură ale benzii 4.1, precum și deficiențe ale glicoforinei C.

Tablou clinic. Expresia clinică și biologică este foarte variabilă; procentul de ovalocite poate varia de la mai puțin de 10%, la 100%. Cele mai multe cazuri care prezintă fenomene clinice manifestă o hemoliză compensată, dar altele pot prezenta o anemie hemolitică severă. Heilmeyer a descris încă în 1950 trei forme clinice de OE: fără hemoliză, cu hemoliză compensată și cu hemoliză decompensată.

Ovalocitoza, în majoritatea cazurilor (50—80%), este clinic latentă, anomalia eritrocitară fiind descoperită întâmplător, cu ocazia efectuării unei hemograme sau a anchetelor familiale când apare mai mult ca o curiozitate morfologică (ovalocitoză „cu gene tăcute"). În alte cazuri, medulograma relevă o celularitate mai bogată, cu predominanța eritroblaștilor cu maturație bună; reticulocitoza și bilirubinemia indirectă sunt ușor crescute, iar durata de viață a eritrocitelor este scurtată. Anemia și icterul lipsesc. Pe parcursul evoluției apar, în unele cazuri, manifestări clinice sporadice și de mică intensitate care ar putea fi etichetate ca

variante ale acestui sindrom. În formele cu numeroase sferocite pe frotiul sanguin diagnosticul se poate preta la confuzii cu SE.

În alte cazuri (10—15%) se constată coexistența anemiei și a coloraţiei icterice și chiar a unor crize tranzitorii de deglobulizare, asemănătoare celor întâlnite în SE. Forma pronunțat eliptică a eritrocitelor (bactericite) provoacă o perturbare a circulației intrasplenice. La aceștia gradul de hemoliză poate fi atât de crescut încât durata de înjumătățire a eritrocitelor, calculată cu izotopi de crom, ajunge la 5 zile, iar reticulocitele cresc la 20% (8). Atât la formele hetero- cât și la cele homozigote, anemia este normocromă. Gradul de hemoliză nu poate fi corelat cu procentul de ovalocite. Fragilitatea osmotică este, în general, normală, dar poate fi ridicată la pacienții cu hemoliză crescută.

Ovalocitoza cu sferocitoză. Este o variantă întâlnită în circa 10% din această categorie. Ovalocitele sunt mai puțin ovale și sunt însoțite de un număr mai ridicat de sferocite. Acești pacienți prezintă un grad moderat de hemoliză, o anemie medie cu splenomegalie și fragiltiate osmotică crescută.

Ovalocitoza cu poikilocitoză la nou-născut. Este o anemie hemolitică moderată, până la severă, caracterizată printr-o morfologie eritrocitară cu bizarerii poikilocitare (înmuguriri, pinocitoză etc.).

PIROPOIKILOCITOZA EREDITARĂ

Piropoikilocitoza ereditară (PPE) este o variantă rară de sferocitoză, respectiv ovalocitoză ereditară, ce se manifestă prin anemie hemolitică severă cu o pronunțată poikilocitoză pe frotiul sanguin și care se accentuează și mai mult la încălzirea sângelui *in vitro*.

Istoric. În 1975 Zackowski (38) descrie o simptomatologie curioasă la trei copii ce proveneau din două familii diferite și care prezentau anemie hemolitică și o poikilocitoză ieșită din comun. La unul din părinți s-a găsit o ovalocitoză medie în timp ce ceilalți trei apăreau normali. Cercetându-se rezistența eritrocitelor la diverși factori fizici și chimici, s-a constatat că eritrocitele acestor copii, incubate la 45°C, realizau o și mai pronunțată poikilocitoză, în timp ce eritrocitele subiecților normali rezistau la 49°C. Fenomenul a fost numit piropoikilocitoză (de la cuvântul gr. *pira*=foc, *poikilos*=diferit, variat și *kitos*=celulă). Această constatare a stârnit un mare interes în lumea hematologilor, după care au fost publicate numeroase cazuri care aveau la bază o sensibilitate a eritrocitelor la căldură. Tot cu această ocazie au fost revizuite unele diagnostice care, până atunci, au fost încadrate în grupul sferocitozelor sau ovalocitozelor severe, iar altele nu purtau decât un diagnostic global de anemie hemolitică atipică (ca și în cazul pacientului nostru).

Primul caz descris la noi a fost al unui tânăr (N.G.F.) care, imediat după împlinirea vârstei de 16 ani, nu a mai fost acceptat în secțiile de pediatrie cărora le-a creat, în decursul anilor, mari probleme de reanimare (mai ales când se interna în cursul serviciilor de gardă). El a fost îndrumat către secția noastră de adulți unde, sosit pentru prima dată (tot în cursul unui serviciu de gardă) a creat aceleași probleme. Bolnavul, deși bine studiat la secțiile de pediatrie, nu se încadra în nici una din formele de anemie hemolitică cunoscute până atunci, purtând, peste tot diagnosticul de „anemie hemolitică atipică".

Patogenie. Tara se transmite în mod autosomal recesiv. Individualizarea și clarificarea substratului ei genetic a coincis cu perfecționarea posibilităților de investigare tehnică încât, curând după descrierea pri-

mului caz, s-au și putut localiza unele din defecțiunile moleculare care stau la baza acestui sindrom. Astfel s-a constatat că nici PPE nu are la bază o unică modificare structurală, ci pot exista mai multe combinații ca și în SE și OE. Neconcordanța față de normal rezidă tot la nivelul rețelei scheletale unde există defecțiuni cantitative și calitative la nivelul lanțurilor fibrilare ale spectrinei. Ca și în cazul hemoglobinozelor și hemoglobinopatiilor, în PPE există tot două mecanisme patogenetice distincte care stau la baza manifestărilor. Primul defect constă într-un deficit cantitativ (ca în talasemie) caracterizat prin reducerea sintezei de spectrină, încât lanțul nu-și găsește perechea, iar al doilea mecanism implică alterarea calitativă a lanțului de spectrină care nu poate asigura asamblarea cu celelalte proteine structurale (de exemplu spectrina $\alpha I/^{4\rightarrow proel6u}$). Deși în condiții normale lanțurile de α spectrină se sintetizează de 2—3 ori în exces față de lanțurile β, cele două polipeptide se asamblează stoechiometric. În cazurile de deficit parțial de spectrină sinteza acestui lanț scade sub nivelul acestor limite. În cel de-al doilea caz s-a dovedit că deși spectrina a fost găsită în citosol, cantitativ normal, funcția ei de asamblare a fost redusă la circa jumătate (12).

Un mare interes în elucidarea acestui sindrom îl au tipurile de alterări biochimice ale părinților și, în general, ale fraților, mai ales când aceștia se compun din mai mulți membri. Astfel, pacienți cu diagnosticul de PPE au fost găsiți în familii ale căror părinți aveau deja diagnosticul pus, fie de sferocitoză, fie, mai ales, de ovalocitoză. Alții au chiar forme clinice inaparente chiar dacă se pot constata, și la ei, alterări biochimice. Din aceste combinații pot rezulta slăbiri ale acelei „somiere" care intră în componența trilaminată a membranei. Astfel, numeroase studii converg spre concluzia că pacienții cu diagnosticul de PPE pot fi și dublu heterozigoți, din părinți cu forme medii, sau silențioase de SE, dar mai ales de OE (21).

Tablou clinic și de laborator. Boala, în general, are expresie clinică pronunțată. Sindromul anemic este sever, rezistența osmotică este scăzută, iar testul de autohemoliză este pozitiv. Bolnavii necesită transfuzii de sânge pentru a supraviețui. Simptomatologia este comparată cu cea a formelor „homozigote" de SE sau OE. În afara „cotei" periodice de sânge pe care o reclamă organismul, ei sunt nevoiți să fie spitalizați, ca urgențe, prin fenomene intempestive de „deglobulizări" asemănătoare celor din cazurile severe descrise în SE. Spitalele neavertizate, care primesc astfel de cazuri, sunt contrariate de simptomatologia acestora care, în afara sindromului de anemie hemolitică severă, constată bizarerii eritrocitare pe frotiul sanguin, alături de normalitatea unor teste specifice pentru anemiile hemolitice, ca electroforeza hemoglobinei, testele Coombs, cercetarea enzimelor eritrocitare, precum și altele care se efectuează pentru elucidarea unor cazuri severe și neclare. Aceste cercetări au fost derutante timp de decenii de când au fost individualizate cele mai frecvente tipuri de anemii hemolitice, fără ca formele de PPE, recent individualizate, să se fi putut încadra în vreuna din ele, chiar și la nivelul spitalelor (pe atunci) bine dotate.

Tratamentul nu diferă de cel al formelor severe de SE și OE. Splenectomia trebuie efectuată chiar dacă rezultatele ei nu sunt atât de spec-

taculare ca în sferocitoză. Filtrul strâns de la nivelul cordoanelor splenice care blochează, în sinusuri, o cantitate atât de mare de poikilocite cu structură rigidă, fiind îndepărtat, acestea ajung să-şi mai continue viaţa şi funcţiile de a transporta oxigenul, un număr suplimentar de zile, chiar dacă procentul, morfologia şi sensibilitatea lor termică cresc şi mai mult după această ablaţie. De aceea rezultatele splenectomiei, la care trebuie totuşi să se recurgă (nefiind alt procedeu mai eficace) dă doar rezultate încurajatoare.

ANEMII HEMOLITICE INTRAVASCULARE (BRUTALE) ANICTERICE

HEMOGLOBINURIA DE MARŞ

Este o tulburare hemolitică intravasculară acută ce se manifestă prin hemoglobinurie şi hemoglobinemie pasageră apărută la persoane ce efectuează activităţi fizice cu contact repetat al extremităţilor la suprafeţe dure.

Fleicher a descris-o pentru prima dată în 1881. Boala este rară; în practica noastră am întâlnit-o de 5 ori la băieţi tineri care au fost obligaţi să parcurgă mulţi km în timp scurt (de exemplu coborâre rapidă de pe munte pentru a prinde trenul).

Semne clinice. Primele manifestări clinice apar la bărbaţi tineri, sub 20 de ani, sau curând după această vârstă şi, excepţional la femei. Mecanismul de declanşare este totdeauna cunoscut: exerciţii puternice şi repetitive în care corpul vine în contact cu şocuri, ca marşuri lungi (manevre militare), alergări de fond (maraton), dansuri sacadate (conga, tam-tam etc.) sau exerciţii de tip carate etc. Hemoliza nu apare la alergările pe iarbă sau la folosirea pantofilor cu talpă elastică, cu ocazia înotului sau a curselor pe bicicletă.

Adesea unicul semn este apariţia, imediat sau la scurt timp după exerciţii, a unor urini de culoare roşie închis, rareori însoţite de alte semne ca greaţă, dureri vagi abdominale sau lombare, frisonete sau senzaţie de arsură în extremităţi. Criza hemolitică se poate repeta curând (dacă a fost de mai mică intensitate) sau după mai multe zile sau săptămâni, timp în care vor ajunge să „îmbătrânească" alte eritrocite.

Examenele de laborator nu indică semne de anemie întrucât distrugerea eritrocitară nu depăşeşte 1% din totalitatea masei eritrocitare, hemoliza producându-se brutal intravascular. Testele osmotice şi mecanice sunt normale. Bilirubina poate fi discretă, fără să depăşească 2 mg%/ml, însă haptoglobina serică scade până la dispariţie, cu creşterea uneori a methemoglobinei. Urina conţine hemoglobină, iar după încetarea atacului conţine hemosiderină.

Patogenia nu este încă pe deplin elucidată, dar există indicii că procesul se situează la nivelul scheletului de membrană care cedează mai uşor la insultele mecanice. Dar au fost descrise şi cazuri de hemoglobinurii de marş însoţite de leziuni cardiace şi de scăderi în sinteza de haptoglobină (28). Această proteină are proprietatea de a se combina ireversibil

cu hemoglobina extraeritrocitară care este astfel transportată și metabolizată mai rapid decât s-ar afla în stare liberă. Haptoglobina este sintetizată de ficat, iar nivelul ei scade în cazurile de insuficiență hepatică. Scăderi se constată și în afara afectărilor hepatice (ahaptoglobinemii) fără creșteri intempestive de hemoglobinurile. În cursul hemolizelor intravasculare haptoglobina liberă este consumată de hemoglobina eliberată din eritrocite într-un ritm care depășește capacitatea de sinteză a haptoglobinei, ceea ce duce la dispariția ei din plasmă (39).

Diagnosticul diferențial trebuie făcut cu alte forme de distrugeri acute de eritrocite: hemoglobinurie paroxistică nocturnă, unele porfirii hepatice, malarie etc. Strivirea de fibre musculare nu provoacă hemoglobinurie.

Tratamentul după atac nu este necesar, dar el trebuie prevenit prin evitarea exercițiilor fizice cu izbituri ritmice și prin folosirea de pantofi cu branț elastic.

PATOLOGIA STRATULUI MEDIU (LIPIDIC ȘI LIPOPROTIDIC) AL MEMBRANEI

Anomaliile mutaționale ale matricei mijlocii lipoproteice ale membranei eritrocitare interesează, pe de o parte, structura celor două straturi asimetrice, iar pe de altă parte, macromoleculele enzimelor implantate în aceste pelicule (proteine integrate) care au și rol de adevărate canale de transport în cele două sensuri (intra- și extraeritrocitar) a cationilor, anionilor și a numeroase molecule cu greutate moleculară scăzută. Patologia celor două componente majore ale membranei (lipidice și a enzimelor integrate) este total diferită. Deși bolile incluse aici sunt extrem de rare, ele au o valoare teoretică importantă pentru înțelegerea patologiei acestei structuri. Acestea aparțin, în principal, patologiei metabolismului lipoproteic dirijate de unele enzime care (în cazuri patologice) lipsesc sau au o capacitate funcțională scăzută. În principal, ele se caracterizează printr-un dezechilibru de sinteze și de degradare lipidică generală (plasmatice) sau locale (structurale) între cei doi poli metabolici: hiperlipemie, respectiv hipolipemie. Creșterea exagerată, respectiv scăderea profundă, a unor produși intermediari lipidici interesează nu numai componentele lipidice ale eritrocitelor, ci și alte structuri unde sunt cuprinse astfel de molecule (mielina din sistemul nervos, vasele sanguine etc.).

TULBURĂRI STRUCTURALE ALE STRATULUI LIPIDIC BILAMINAT

ACANTOCITOZA

Este o maladie morfofuncțională a eritrocitelor, întâlnită în unele anemii hemolitice. Acestea apar sferice și sunt acoperite de spini regulați și fini, iar pe frotiu apar ca frunzele de acant.

ACANTOCITOZA ÎN ABETALIPOPROTEINEMIA FAMILIALĂ

Este o boală ereditară rară (circa 100 de cazuri publicate), cu transmitere autosomal-recesivă, cunoscută și sub denumirea de sindrom Bassen-Kornzweig. Substratul patogenic al bolii constă într-un deficit de sinteză a proteinei B, care este o fracțiune legată de componentele lipidice ce migrează cu componentele beta și prebeta. Consecința acestei perturbări metabolice este acumularea de trigliceride la nivelul vilozităților mucoasei intestinale, cu imposibilitatea formării chilomicronilor din trigliceride și instalarea unui sindrom de malabsorbție lipidică. Aceasta are ca urmare carența vitaminelor liposolubile (A, D, E) și duce la procese de demielinizare (cordoane posterioare, nervi periferici), leziuni degenerative ale neuronilor motori centrali din coarnele anterioare etc. (27, 28, 29).

Tabloul clinic prezintă un sindrom digestiv și unul neurologic; sindromul hematologic și cel retinian sunt secundare acestora. Copiii mici (și chiar nou-născuții) prezintă diaree cu scaune voluminoase și grăsoase, anorexie, distensie abdominală, vărsături, prostrație. Urmare procesului de malabsorbție, copiii suferă de o întârziere staturoponderală. Tulburările neurologice apar mai târziu (școlari, adolescenți), cu semne de neuropatie periferică (tulburări motorii, amiotrofie, tulburări de sensibilitate etc.). Tulburările de vedere sunt și ele tardive și se manifestă prin reducerea acuității vizuale, scotoame etc.

Sindromul anemic se datorește atât procesului metabolic afectat, cât și carenței de aport de factori necesari eritropoiezei. Anemia este moderată, cu prezența eritrocitelor cu aspect de frunze de acant (crenelate) în proporție de 25—50%. Rezistența osmotică este normală, în timp ce rezistența mecanică și termică apar scăzute. Hemoliza este produsă mai mult prin tulburări reologice, eritrocitele apărând incapabile să străbată capilarele și mai ales aperturile înguste care limitează sinusurile splenice unde sunt sechestrate și apoi distruse. Durata de viață a eritrocitelor este scăzută. Studiile biochimice au demonstrat modificări structurale ale membranei lipidice (scăderi ale fosfolipidelor și acizilor grași și creșterea colesterolului). În mucoasa intestinală se constată o acumulare de trigliceride sub forma de picături lipidice în citoplasma celulelor epiteliale de la nivelul vilozităților, de unde și imposibilitatea formării de chilomicroni din trigliceride. Pe lângă acest tablou clinic și paraclinic caracteristic, diagnosticul se stabilește și prin lipidograma cu elemente caracteristice: hipolipemie (1—1,5 g/l), hipocolesterolemie (<0,8 g/l), trigliceride (0,20 g/l), fosfolipide (<1 g/l), prezența de alfa-lipoproteine și absența chilomicronilor și fracțiunilor β.

Tratamentul duce la ameliorarea evoluției bolii, deși boala este ereditară. El constă în excluderea grăsimilor naturale din alimentație și înlocuirea lor cu trigliceride mai bine absorbabile. La aceasta se adaugă vitaminele, D, A, E și preparate de calciu.

ACANTOCITOZE EREDITARE FARĂ ABETAPROTEINEMII

Sunt descrise unele observații de acantocitoză independente de sindromul Bassen-Kornzweig dar, în general, cu manifestări neurologice.

S-a mai decris, de asemenea, și o anemie hemolitică având un substrat morfologic eritrocitar cu grad variabil de acantocite, în cirozele hepatice etilice, în cursul afecțiunilor hepatobiliare grave ale nou-născutului și sugarului, în insuficiențe tiroidiene (hipotiroidism, mixedem), precum și la persoane care au suferit arsuri grave pe întinderi de peste 30% din suprafața corporală. O acantocitoză moderată a fost descrisă la unii splenectomizați.

PATOLOGIA LIPOPROTEINELOR INTEGRATE

STOMATOCITOZA EREDITARĂ

Se caracterizează prin aspectul specific al frotiului de sânge care ne frapează prin prezența unor adâncituri necolorate ce traversează eritrocitul de la un capăt la altul asemenea unei guri (*stoma*, cuvânt gr.= gură). Ele au mai fost comparate cu o scoică de mare, cu o minge înțepată, cu o boabă de cafea sau cu un șliț. Dar acest aspect este caracteristic numai pentru eritrocitele uscate; pe preparatele umede eritrocitele au aspect de bilă sau de gogoașă, situație în care ele sunt numite hidrocite. Anomalia este legată mai mult de acest aspect întrucât membrana lor are un conținut crescut de lipide (mai ales fosfatidilcolină). Ele au o permeabilitate crescută pentru sodiu și potasiu, un transport crescut și activ pentru acești cationi, un exces de apă și o concentrație scăzută de hemoglobină. Fragilitatea osmotică este crescută, iar autohemoliza este de asemenea crescută, dar se corectează la adaosul de glucoză. Unii pacienți prezintă și un grad de anemie cu splenomegalie, dar splenectomia corectează parțial anemia (10).

Această curiozitate hematologică este extrem de rară în zona noastră geografică, dar este întâlnită, într-o proporție de 10—15%, la populația aborigenă din Malaezia și, în proporție mai redusă, în zonele învecinate (ca Insulele Filipine). Se transmite autosomal dominant. Specificul morfologic și funcțional este situat întrucâtva la polul opus față de xerocitoza ereditară unde eritrocitele apar uscate.

XEROCITOZA EREDITARĂ

Este o altă formă de anemie hemolitică ereditară cu defect în structurile lipidoproteice ale membranei în care aceste componente sunt în dezechilibru, iar membrana nu-și poate păstra unitatea funcțională și se produc pierderi de substanță fără să apară sferocite și nici stomatocite pe frotiul uscat. După o scurtă incubare a eritrocitelor se constată desprinderi de formațiuni mielinice de pe suprafața eritrocitară. Exercițiile fizice accentuează aceste pierderi.

Modul de transmitere este autosomal dominant. Ea a fost numită xerocitoză (cuv. gr.=uscat) deoarece eritrocitele pierd, parțial, conținutul lor de apă, apar zbârcite, cu aspect de prune uscate. Prin aceasta pompa ionică este perturbată, potasiul nu poate fi reținut în eritrocit, iar conținutul total de cationi scade din cauza unui eflux pasiv al potasiului. Rezistența osmotică este crescută. Deshidratarea duce la creșterea viscozității intraeritrocitare, acestea devin rigide, iar riscul sechestrării sple-

nice duce la accentuarea hemolizei (24). Deşi activitatea pompei Na/K creşte compensator de 5—10 ori, defectul de permeabilitate a cationilor este incomplet echilibrat. Dar alterarea pompei ionice eritrocitare mai poate apărea în numeroase cazuri, independent de alterarea metabolismului lipidic ca, de exemplu, în siclemie, hemoglobinopatia C, enzimopatii şi altele, toate având consecinţe apropiate, elementul principal fiind hemoliza (21).

PATOLOGIA STRATULUI SUPERFICIAL

BOALA GRUPULUI ERITROCITAR Rh NUL

Deşi este foarte rar întâlnită (1 caz la 6 milioane de locuitori în Germania), prezintă particularitatea că purtătorul ei suferă de o anemie hemolitică cronică, sugerând că absenţa antigenelor corespunzătoare acestui sistem sunt răspunzătoare şi de leziunile unor structuri ale membranei eritrocitare sau că aceste antigene ar avea unele atribuţii în creşterea rezistenţei membranei. Anemia hemolitică se manifestă numai la homozigoţi, este bine tolerată, apare în puseuri cu ocazia unor agresiuni diverse, iar ca semne de laborator s-a constatat o fragilitate osmotică crescută. Pe frotiul sanguin se descrie o poikilocitoză cu prezenţa unor stomatocite.

BIBLIOGRAFIE

1. ALBERTS B. şi colab.: Biologie moléculaire de la cellule, Edit. Flammarion, Paris, 1987.
2. BENGA GH.: Biologia moleculară a membranelor cu aplicaţii medicale, Edit. Dacia, Cluj-Napoca, 1979.
3. BOIVIN P.: Nouv. Presse Méd. 1982; 11: 2347.
4. BRANTON D., COHEN C., TYLER J.: Red Cell. 1981; 24: 24.
5. BUNN H. F.: În HARRISON T. R. (ed.): Internal Medicine, Edit. International, 1991; 2, 1514.
6. CARTRON J. P., SALMON CH.: Rev. Fr. Transf. Immunohem. 1978; 21: 875.
7. CLARK M. R., MOHANDS N., SHOHET S.: Curr. Hematol. 1983; 23: 149.
8. COHEN A. M. şi colab.: Blood 1986; 68: 920.
9. COMBOY J. şi colab.: New Engl. J. Med. 1986; 315: 680.
10. COOPER R. A.: În HARRISON T. R. (ed.): Internal Medicine, Edit. International, 2, 1537.
11. GARBARZ M. şi colab.: Blood 1986; 67: 1661.
12. GOODMAN S. R., KESSELRING, WEIDNER S., EYSTER M.: Blood 1982; 60: 772.
13. GOODMAN S. R., SHIFFER K.: Am. Phys. Soc. 1983; 244: 121.
14. HALBHUBER K. J. şi colab.: Exp. Pathol. 1984; 25: 35.
15. HANSPAL M., HANSPAL J. S. şi colab.: Blood 1993; 5: 1652—60.
16. HEILMEYER L., BUSCH D.: Blut und Blutkrankheiten, Edit. Springer, Berlin, 1972.
17. IAROCCI T. A. şi colab.: Blood 1988; 71: 1390.
18. IZRAEL V.: Actual. Hématol. 1972; 6: 69.
19. JULIEN M., BOUSQUET R.: Actual. Hématol. 1972; 3: 131.
20. KNOWLES W., MARCHESSI S. L., MARCHESI V. T.: Sem. Hematol. 1983; 20: 159.
21. LAMBERT S., CONBOY J., ZAIL S.: Blood 1988; 72: 1926.
22. LECOMTE M. CH., DHEREMY D. şi colab.: Blood 1985; 65: 1208

23. LEFRÈRE J. J., SOULIER J. P.: Presse méd. 1986; 15: 703.
24. LUX S. E., WOLFE L. C.: Ped. Clin. North Am. 1980; 27: 463.
25. MARCHESI S., KNOWLES W. şi colab.: Blood 1986; 67: 141.
26. MAXIMILIAN C.: Sfatul genetic, Edit. Medicală, Bucureşti, 1985.
27. MEYER PH., GARAY R. P.: Nouv. Presse Méd. 1982; 11: 517.
28. MOHLER D. D., THORUP O.: În THORUP O. (ed.): Fundamentals of Clinical Hematology. Edit. Saunders, 1987, 251—348.
29. MORLÉ L. şi colab.: Blood 1988; 70: 508.
30. MORINET F.: Sem. Hôp. Paris 1988; 64: 255.
31. NICOLAU I., GOLDIŞ GH.: Anemiile hemolitice la copii, Edit. Academiei, Bucureşti, 1962.
32. ORSINI A. şi colab.: Hématologique pédiatrique, Edit. Flammarion, Paris, 1982.
33. PINDER J., CHUNG A., REID M., GRANTZER N.: Blood 1993; 82: 3482.
34. POPESCU V., ARION C., DRAGOMIR D.: Icterele nou-născutului, sugarului şi copilului, Edit. Medicală, Bucureşti, 1986.
35. SAVVIDES P. şi colab.: Blood 1993; 82 (10): 2953.
36. SINGER S. J., NICOLSON G. L.: Science 1972; 175: 720.
37. SPÂRCHEZ T., GINGOLD N.: Med. Int. 1963; 15: 1465.
38. VENEZIA D. şi colab.: Blood 1993; 82: 1661.
39. VÂLCU A.: În BERCEANU ŞT. (ed.): Hematologie clinică, Edit. Medicală, Bucureşti, 1977, 240.
40. VÂLCU A. şi colab.: Comunicare U.S.S.M., Bucureşti, secţia Hematologie, 27 ianuarie 1986.
41. WAKUI H., IMAI H. şi colab.: Blood 1988; 72: 408.
42. WAUGH R. E.: Blood 1986; 68: 231.
43. WILLIAMS J. W., BEUTLER R. E., ERSLEV J. A., LICHTMAN A. M.: Hematology, McGraw-Hill Book Co., New York, 1983.
44. WINTROBE M., LEE R., BOGGS D., BITTHEL T., FORESTER J., ATHENS J., LUKENS Y.: Clinica Hematology, Edit. Lea and Febiger, Philadelphia, 1981.
45. ZARKOWSKY H. S., MOHANDS N., SPEAKER C. B., SHOHET S. B.: Br. J. Hematol. 1975; 29: 537.

XXVIII

HEMOGLOBINURIA PAROXISTICĂ NOCTURNĂ

DAN COLIȚĂ

Hemoglobinuria paroxistică nocturnă (HPN) este o boală dobândită clonală care afectează populația de celule stem mieloide din măduva osoasă (MO). Acestea dobândesc un defect structural al membranei externe pe care-l transmit descendenților lor eritrocitari, granulocitari și trombocitari. Defectul constă în alterarea exprimării unor glicoproteine, care inhibă asamblarea fracțiunilor complementului în complexe cu potențial litic pe suprafața acestor celule. Lipsite de protecție, elementele circulante devin vulnerabile la acțiunea litică a complementului activat din plasmă. Efectele cele mai evidente se observă la nivelul eritrocitelor circulante, cu instalarea unui proces continuu de hemoliză intravasculară cronică pe fondul căruia survin accese acute hemolitice manifestate prin hemoglobinurie.

HPN a mai fost denumită și anemia hemolitică cronică cu crize de hemoglobinurie nocturnă paroxistică, anemie hemolitică cu hemosiderinurie perpetuă, anemie splenomegalică cu hemoglobinurie-hemosiderinurie, sindrom Marchiafava-Micheli.

Istoric. Prima descriere a bolii aparține lui Strübbing în 1882, care a semnalat și legătura dintre administrarea de fier și apariția hemoglobinuriei. Marchiafava și Nazari (1911) și Micheli (1931) au precizat tabloul clinic al bolii. În 1937, Ham a evidențiat liza *in vitro* a eritrocitelor bolnavilor de către serul normal acidifiat, stabilind astfel principiul celui mai valoros test de diagnostic al bolii. Ulterior, Crosby, Dacie și Hartmann au descris noi teste de diagnostic și au formulat unele explicații patogenice și principii terapeutice. În 1964, Yachnin a semnalat rolul fracțiunii C_3 a complementului în liza eritrocitelor din HPN. După 1970, Götze și Müller-Eberhard au descris „calea alternativă" de activare a complementului și au formulat ipoteza lizei eritrocitelor din HPN prin fracțiunea C_3 activată prin această cale. Rosse și Dacie confirmă mai recent ipoteza mai veche a existenței mai multor populații de eritrocite în raport cu sensibilitatea față de acțiunea litică a complementului. În ultima decadă s-au stabilit bazele moleculare ale fiziopatologiei bolii.

Etiopatogenie. HPN afectează ambele sexe fără preferință familială sau rasială. Boala a fost semnalată la toate vârstele, dar cu frecvență maximă la adulții tineri (25—45 ani) (43). Incidența bolii este redusă (28 de cazuri în Clinica de Hematologie Fundeni pe durata a 20 de ani).

Cu o singură excepție, publicată recent, HPN apare ca un defect *dobândit* al membranei celulare care este decelabil atât la eritrocite cât și la granulocite și la trombocite. Acest fapt susține ideea că leziunea primară afectează progenitorul comun al acestor 3 linii celulare, adică populația de celule stem mieloide. Există și dovada că HPN este o boală monoclonală, argumentată de modelul repartiției intracelulare a izoenzimelor G6-PD la bolnavele cu HPN care sunt heterozigote pentru această enzimă: în celulele HPN, cu defect de membrană, există un singur tip de izoenzimă, în timp ce restul celulelor normale conține ambele izoenzime (28).

S-a presupus că injurii ale măduvei de cauză necunoscută, care afectează celulele stem mieloide, pot induce mutații ale acestora, urmate de apariția unei clone anormale ai cărei descendenți sunt eritrocitele, granulocitele și trombocitele cu defect de membrană și cu sensibilitate particulară la acțiunea complementului. Această clonă ar beneficia de un avantaj selectiv care-i permite să se dezvolte progresiv în dauna populațiilor de celule normale din măduvă. Fenomenul este asemănător celui observat în leucemiile acute cu deosebire că, în HPN, clona mutantă nu are caractere aparente de malignitate și poate uneori să dispară treptat, explicând în acest mod remisiunile spontane semnalate în unele cazuri.

În majoritatea cazurilor, HPN apare ca o afecțiune probabil idiopatică. Alteori defectul biologic specific al HPN (existent doar ca manifestare de laborator sau exprimat prin cortegiul de tulburări caracteristice bolii) apare în asociere cu alte stări patologice ale celulelor stem: anemia aplastică, anemia refractară cu exces de blaști, eritroleucemia, mielofibroza cu metaplazie mieloidă (5, 9, 21, 33, 31). Toate aceste entități au ca elemente comune deprimarea creșterii în cultură a celulelor stem medulare și posibilitatea transformării lor în leucemie acută mieloblastică. Pe aceste baze s-a argumentat pentru încadrarea HPN în grupul stărilor mielodisplazice (43), cu toate că o interrelație cauzală directă între HPN și celelalte afecțiuni semnalate mai sus nu a fost dovedită. O relație mai specială ar putea exista totuși cu aplazia medulară, care într-un număr semnificativ de cazuri (până la 30%) precedă anamnestic instalarea HPN sau complică evoluția acesteia. S-a presupus că momentul refacerii măduvei hematopoietice după o stare aplazică ar putea fi o condiție favorizantă pentru apariția unor evenimente mutagene ale celulelor stem, printre care și mutația HPN; în acest context HPN ar putea fi considerată ca o boală în 2 timpi, din care primul este anemia aplazică.

În 1990, Yamashina și colab. (44) au publicat studiul complet al unei familii în care propozitul (cu formă severă de HPN) și părinții săi (veri primari, aparent sănătoși) prezintă unul din defectele moleculare asociate cu HPN. În acest caz, HPN apare ca expresia unui defect molecular ereditar de tip autosomal recesiv.

Fiziopatologie. Secvența mecanismelor fiziopatologice din HPN este ilustrată schematic în figura XXVIII.1.

Tulburarea centrală a bolii constă din selectarea clonei de celule stem HPN+, cu defect specific de membrană. Acest defect este transmis descendenților eritrocitari, granulocitari și trombocitari ai clonei HPN+. El generează o scădere a rezistenței acestor celule față de acțiunea complementului activat care există în mod permanent în plasma bolnavilor

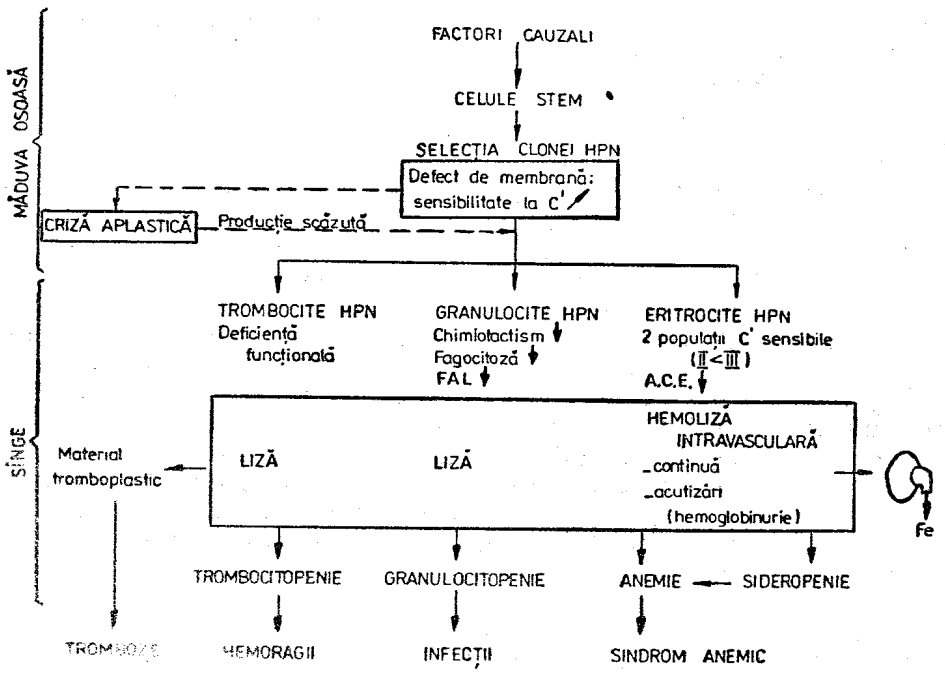


Fig. XXVIII.1. — Schema hemoglobinuriei paroxistice.

și din care rezultă liza lor accelerată în circulație (9, 15). Mecanismele activării complementului la bolnavii cu HPN nu prezintă nici o anomalie. Ele sunt inițiate prin cele 2 căi — „clasică" (dependentă de anticorpi) și „alternativă" (declanșată de agenți patogeni, de produsele acestora sau de alți factori care apar în plasmă). Caracteristic pentru HPN este faptul că celulele circulante HPN+ sunt lizate de către complementul activat prin calea alternativă (16).

În ultimii ani s-au descris mai multe leziuni moleculare asociate cu HPN. Cercetări mai ample au putut fi efectuate asupra eritrocitelor. În condiții normale eritrocitele se apără împotriva efectelor litice ale complementului activat cu ajutorul unor molecule protectoare. Acestea împiedică desfășurarea pe suprafața celulară a secvențelor căii comune a activării complementului. Moleculele protectoare descrise până în prezent sunt: 1) DAF (*decay accelerating factor*) CD55, care dezasamblează convertazele C_3 pe măsura formării lor și induce disocierea C_3 atașat pe eritrocite (28, 33, 34); 2) HRF/C'8bp *(homologous restriction factor* sau

C'8 *binding protein*), o glicoproteină de 65 000 Da, care inhibă asamblarea complexelor de atac ale membranei (18, 45); 3) HRF_{20} (CD59), cu greutate moleculară de 20 000 Da, și cu efecte identice cu cele ale HRF, ceea ce l-a determinat pe Okada (27) să propună denumirea de mai sus [alți autori, care au descris independent aceeași glicoproteină, au propus alte denumiri ca „MACIF" *(membrane-attack-complex inhibitory factor)* sau „MIRL" *(membrane inhibitor of reactive lysis)*] (19, 40). Rolul jucat de CD59 în eritroliză este subliniat de două particularități: este singura anomalie decelată la bolnavul studiat de Yamashina (44), iar incubarea eritrocitelor HPN^+ cu această proteină anulează liza lor *in vitro*, indusă de complement (27).

Studiul eritrocitelor HPN^+ a evidențiat și alte leziuni membranare: deficiența de glicoproteină alfa (29), deficiența LFA_3 *(lymphocyte-function associated antigen)* (14), o glicoproteină de adeziune din superfamilia integrinelor și deficiența de acetilcolinesterază (ACE) (6, 13). Scăderea activității ACE este proporțională cu severitatea hemolizei *in vivo* (20). Cu toate acestea nu s-a demonstrat nici o influență directă între absența moleculelor de enzimă de pe suprafața eritrocitelor și interacțiunea dintre eritrocite și complement (43).

CD55, CD59, C8bp, LFA_3 și ACE sunt ancorate în membrana eritrocitelor normale printr-o piesă de legare de glicozil-fosfatidil-inozitol (GFI) care este deficitară în HPN. Aceasta a făcut să se nască speculația că toate anomaliile moleculare ale HPN ar reflecta o perturbare a ciclului biosintezei fosfatidil-inzitolului (10).

Recent s-a demonstrat că deficiența de ancorare prin GFI se datorește unui defect al genei PIG-A (pentru fosfatidil-inozitolglican clasă), găsit la toți bolnavii cu HPN, deși este probabil ca diferite mutații să fie responsabile la diverși bolnavi (37 a).

Efectul litic al complementului asupra eritrocitelor HPN^+ este inegal. Eritrocitele tinere (reticulocitele) sunt mai sensibile decât eritrocitele senescente. W. F. Rosse și colab. (32) au arătat că eritrocitele HPN^+ pot fi subîmpărțite în 3 populații cu sensibilitate diferită față de complement: populația de tip I este alcătuită din celule cu sensibilitate normală; populația de tip II este de 3—5 ori mai sensibilă ca prima; populația de tip III este de 15—25 de ori mai sensibilă decât cea normală. Aceste diferențe se explică, pe de o parte, prin aceea că celulele de tip II și III sunt mai avide de C_3 decât cele normale și, pe de altă parte, prin faptul că intensitatea lizei induse de o cantitate dată de C_3 este mai mică pentru populația de tip II în comparație cu populația de tip III. Aviditatea sporită a membranei eritrocitelor HPN^+ pentru complement ar putea fi explicată de absența glicoproteinelor protectoare. Deficitul în DAF pare să se constituie pe parcursul maturației seriei roșii și afectează în final eritrocitele HPN^+ de tip II și III. Liza mai intensă a eritrocitelor HPN^+ de tip III s-ar explica printr-un defect funcțional adițional de HRF sau/și de HRF_{20} care ar permite atașarea mai ușoară a complexului efector ($C'_{5b} \ldots C'_9$) pe suprafața lor (25, 33). Majoritatea bolnavilor prezintă cel puțin 2 din aceste subpopulații de eritrocite HPN^+. Asocierea cea mai frecventă este aceea dintre eritrocitele I și III (78%), urmate de asocierile I+II (9%), I+II+III (9%), II+III (3%). S-au citat cazuri „pure" la care există numai eritrocite HPN^+ de tip

II (1%). Acestea sunt și cele mai blânde. Gravitatea manifestărilor clinice este legată de procentajul atins de eritrocitele HPN+ de tip III: <20%=boală ușoară; 20—50%=evoluție cu puseuri intermitente de hemoliză severă; >50%=boală severă (34). Proporția maximă de eritrocite de tip III este atinsă după 2—3 ani de la debutul real al bolii. Ea poate rămâne constantă sau poate să scadă treptat în câțiva ani și, paralel cu aceasta, să descrească și gradul hemolizei. Condițiile care măresc masa de celule sensibile (criza reticulocitară după feroterapie), factorii care precipită activarea C′ (infecțiile) sau aportul de C′ (transfuziile cu sânge integral) pot duce la activarea hemolizei. Explicarea exacerbării nocturne a hemolizei este încă subiect de controversă (43).

Granulocitele și trombocitele HPN+ prezintă la rândul lor o sensibilitate crescută la liză în ser acidifiat și o legare crescută de anticorpi și C′ asociată cu absența DAF (25).

Citodistrucția continuă a elementelor figurate ar explica asocierea HPN cu un grad variabil de pancitopenie. Aceasta poate fi mai severă dacă boala survine pe un fond de hipoplazie medulară preexistentă sau se poate agrava rapid dacă evoluția HPN se complică cu un episod de criză aplastică.

Hemoliza din HPN este intravasculară și continuă, cu descărcare de hemoglobină în plasma circulantă. Eliminarea renală continuă a hemoglobinei saturează mecanismele celulelor tubulare de catabolizare a hemului și se însoțește de hemosiderinurie și hemoglobinurie urmate, la rândul lor, de depleția fierului și de agravarea anemiei.

Proporția granulocitelor HPN+ prezente în circulație poate varia între 9 și 90%. Capacitatea lor chimiotactică și fagocitară este subnormală. Neutropenia este adesea prezentă, prin cauze diverse: liză, marginație excesivă, granulopoieză ineficientă, hipoplazie medulară (8, 15, 39).

Leucopenia și tulburările funcționale ale granulocitelor explică asocierea frecventă a infecțiilor. Acestea acționează în plus și ca factori de risc pentru agravarea hemolizei.

Ca și celelalte elemente figurate, trombocitele HPN+ sunt lizate *in vitro* în mediu acid de către complementul activat care se fixează în concentrații mari pe membrana lor (12). Asocierea trombocitopeniei se datorește însă *in vivo* unui defect de producție.

Cazurile cu trombocitopenie severă se pot complica uneori cu episoade hemoragice. Mai frecvent însă HPN se însoțește de un risc crescut pentru instalarea unor accidente trombotice. Activarea hemostazei în HPN este complexă (fig. XXVIII.2). Ea implică activarea trombocitelor (ca urmare a atașării C'_3 și a eliberării de ADP din eritrocitele lizate) și activarea coagulării plasmei la care concură factorii tromboplastici eliberați în urma citodistrucției și jocul interrelațiilor dintre complementul activat și factorul XII de contact (2, 12). Se constituie în acest mod o stare de hipercoagulabilitate care favorizează instalarea trombozelor, dar care ascunde și riscul potențial al asocierii fenomenului de coagulare intravasculară diseminată (CID). Astfel, din 56 de testări ale coagulării efectuate în Clinica de Hematologie cu ocazia investigării unor bolnavi cu HPN și cu accidente trombotice s-au evidențiat profile de CID în 12 cazuri (7).

Tabloul clinic. În forma tipică, debutul este insidios, cu paloare, subicter, splenomegalie moderată, hepatomegalie ușoară (inconstant), emisiune de urini hipercrome. Acestei stări de fond i se suprapun accesele de hemoglobinurie caracteristice: eliminarea unor urini de culoare foarte închisă (rubinii sau negre), stare de rău general, febră, vărsături, lombalgii. Crizele de hemoglobinurie sunt semnalate la aproximativ 25% din cazuri (43). Ele apar de obicei după $2^1/_2$—3 ani de la debutul hemolizei cronice (9), dar sunt citate cazuri în care acest interval poate fi mult mai mare (10 ani într-o observație personală). Clasic, hemoglobinuria este asociată cu somnul de noapte (urina de dimineață este de culoare închisă și redobândește aspectul normal în cursul zilei). Hemoglobinuria poate fi declanșată însă și de somnul de zi, efort fizic, menstre, vaccinări, infecții, feroterapie sau alte medicații (sulfamide, aspirină, penicilină, heparină), transfuzii cu sânge integral, intervenții chirurgicale sau poate să se instaleze fără cauză aparentă. În formele grave, accesele de hemoglobinurie se însoțesc de frison violent, cefalalgii, mialgii și/sau lombalgii intense, paloare și dispnee rapid progresive, colaps și, uneori, anurie. În alte cazuri, episoade neregulate de hemoglobinurie pot evolua mai multe zile sau săptămâni. La un număr de bolnavi, accesele se pot rări sau dispărea cu totul. S-au citat cazuri care evoluează cu tabloul unei anemii cronice, fără apariția hemoglobinuriei manifeste.

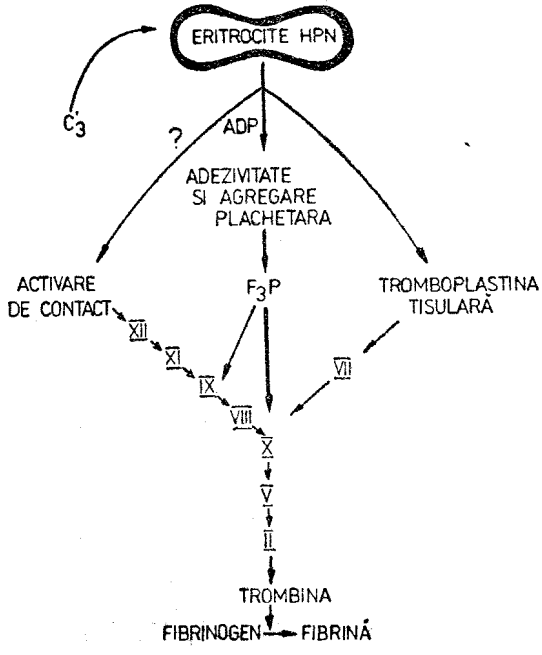


Fig. XXVIII.2. — Mecanismele activării hemostazei în HPN.

În formele cu debut atipic, primele manifestări ale bolii pot fi reprezentate de crize dureroase abdominale și/sau lombare, crize cefalalgice repetate, tromboze venoase, infarcte viscerale, puseuri de hemoliză posttransfuzională în absența izoimunizării. Alte cazuri au fost precedate de tabloul anemiei hipocrome feriprive, al purpurei trombocitopenice sau de instalarea unei mielofibroze (22). Aproximativ 15% din cazuri pot debuta printr-o anemie aplastică. În toate situațiile semnalate tabloul clinic sugestiv se constituie tardiv în evoluția bolii.

Examene de laborator. În sângele periferic se găsește frecvent o pancitopenie. Anemia este, în general, accentuată cu ușoară macrocitoză și policromatofilie. În cursul crizelor de hemoglobinurie pot apărea schizocite și normoblaști, dar niciodată microsferocite. Eritrocite fragmentate

mai pot fi observate și în asociere cu trombozele profunde. Odată cu instalarea depleției de fier, anemia se agravează și devine microcitară-hipocromă. Leucopenia cu neutropenie poate fi observată la 60% din cazuri și poate fi mai severă la pacienții cu splenomegalie importantă. Aspectul granulocitelor este normal, dar fosfataza alcalină leucocitară (FAL) este mult redusă sau absentă. Trombocitopenia a fost semnalată la 2/3 din bolnavi (15).

Măduva osoasă este, în mod obișnuit, hipercelulară, prin hiperplazie eritroblastică. Absența hemosiderinei medulare este frecvent constatată. În unele cazuri se observă o reducere a megacariocitelor. Alteori se instalează hipoplazia tuturor seriilor mieloice și, paralel, accentuarea pancitopeniei cu reticulocitopenie.

În general, plasma este icterică și conține cantități mari de bilirubină prehepatică (indirectă) și urme de Hb liberă. Hemoglobinemia este mult crescută în timpul crizelor de hemoliză acută când sângele capătă un aspect lacat, iar plasma devine roșiatică.

În urină, care de obicei este hipercromă, se evidențiază permanent urobilinogen și hemosiderină și hemoglobină în cursul crizelor de hemoliză acută.

Alte examene de laborator: fragilitatea mecanică și osmotică a eritrocitelor este normală. Testul Coombs cu ser anti IgG este negativ, dar poate fi pozitiv cu ser anti C′ ca expresie a vocației eritrocitelor de a atașa molecule de C_{3b}. Structura Hb este normală. Singura modificare enzimatică eritrocitară este scăderea acetil-colinesterazei globulare. Cu microscopul electronic s-au constatat leziuni ale membranei eritrocitelor, constând din mici pete, orificii sau fisuri, cu semnificație incertă, rezultate în urma atacului complementului activat. La fel, atașarea compusului C'_9 pe trombocite este urmată de formarea unor vezicule superficiale. Acestea ar conține material procoagulant de tipul protrombinazei care, prin descărcare, ar explica tendința la tromboze a HPN.

În plasmă se evidențiază scăderea haptoglobinei și, frecvent, hiposideremie și creșterea capacității totale de legare a Fe. Spolierea rezervelor de fier, ilustrată și de lipsa hemosiderinei medulare și a sideroblaștilor este consecința excreției urinare zilnice de fier, care oscilează între 1 și 16 mg/100 ml, în strânsă legătură cu variațiile hemoglobinei (42).

Testele de hemostază pot detecta semne de hiperagregabilitate plachetară *in vitro* sau semne de hipercoagulabilitate.

Testele serologice specifice constituie baza diagnosticului HPN și exprimă sensibilitatea crescută a eritrocitelor bolnavului la acțiunea litică a complementului (C′). În tabelul 28.I sunt reprezentate, schematic, principiul și valoarea testelor serologice.

Evoluție, complicații. HPN este o boală cu evoluție lungă și capricioasă. Intensitatea, durata și frecvența crizelor de hemoglobinurie sunt imprevizibile. Ele diferă de la un bolnav la altul sau chiar pe parcursul evoluției aceluiași caz.

Evoluția HPN poate fi complicată de instalarea infecțiilor, a crizelor aplastice și a trombozelor venoase. Infecțiile pot precipita instalarea hemoglobinuriei macroscopice. Aplazia medulară agravează pancitopenia și

se însoțește de accentuarea anemiei, de scăderea capacității de apărare antiinfecțioasă și de manifestări hemoragice. La unii pacienți cu evoluție severă s-au decelat semne de mielofibroză.

Există o mare predispoziție pentru instalarea accidentelor trombotice (17,85% din cazurile urmărite în clinică), cu afectarea predilectă a

TABELUL 28.I

Diagnosticul serologic al HPN

Denumirea testului	Principiul testului	Valoarea testului
1. Testul cu ser acidifiat (Ham)	Serul normal, acidifiat la pH 6,5—7,0 hemolizează în mod constant eritrocitele HPN, dar nu și pe cele normale, folosite ca martor. Prin încălzirea prealabilă a serului la 56°C (inactivarea complementului), liza nu se mai produce. Serul bolnavului nu lizează *in vitro* hematiile proprii (conținut redus de complement)	Prin simplitate și precizie, constituie cel mai valoros test pentru diagnosticul HPN. Sistemul poate produce și liza eritrocitelor din anemia diseritropoietică congenitală tip II sau din unele anemii hemolitice autoimune. În primul caz, testul Ham efectuat cu seruri normale diferite este inconstant pozitiv; testul cu sucroză este negativ. Lipsesc semnele de hemoliză intravasculară. În anemia autoimună, hemoliza este accentuată și cu ser neacidifiat (autolog sau izolog) și cu ser încălzit în prealabil. Testul Coombs este pozitiv
2. Testul cu sucroză sau testul cu apă-zahăr (Hartmann și Jenkins)	Soluțiile de zaharuri simple, cu putere ionică joasă, favorizează activitatea complementului și atașarea lui pe hematii. Sistemul este activ numai asupra eritrocitelor HPN	Test simplu și fidel, folosit inițial ca test prezumptiv. În prezent, cu unele îmbunătățiri ale tehnicii, este considerat ca test de rutină în diagnosticul HPN alături de testul Ham
3. Testul lizei prin anticorpi (Dacie, Lewis și Tills)	Concentrațiile mici de anticorpi izoimuni, în prezența complementului, favorizează liza eritrocitelor HPN și nu acționează asupra celor normale	Dificultățile în pronunțarea anticorpilor specifici limitează folosirea sa în mod curent. În anumite condiții permite stabilirea procentajului de eritrocite complement sensibile din HPN

sistemului venos (și mai ales celui portal). Manifestările trombotice pot îmbrăca aspectul unor accidente minore (cu simptomatologie nespecifică) sau pot fi exprimate în sectoare vasculare cu topografie precizabilă (tabelul 28.II).

Absența modificărilor testelor de coagulare nu exclude riscul instalării trombozelor deoarece starea de hipercoagulabilitate este indelebilă, ca și hemoliza de fond care o generează și o întreține. De aceea trombozele constituie un pericol potențial permanent. Apariția lor nu se suprapune pe momentele de hemoliză accentuată cu hemoglobinurie, ele putând surveni și la subiecți cu hemoliză compensată.

TABELUL 28.II

Manifestări trombotice în HPN (7)

Manifestări clinice și localizări trombotice	Număr de cazuri (23 cazuri)
A. *Accidente minore*	
Dureri lombare sau abdominale neexplicabile	9
Crize cefalalgice	3
B. *Tromboze la nivelul unor sectoare vasculare precizabile*	
Cerebral	2
Brahial	2
Portal	1
Splenic	1
Suprahepatic (S. Budd-Chiari)	1
Crural	1
Artera mezenterică superioară	1
Artera renală (cu RTA renovasculară)	1
Hemoroidal	1

Sarcina reprezintă un factor agravant, atât prin limitele impuse tratamentului bolii, cât și prin complicațiile posibile pe care le induce (accentuarea hemolizei, infecții, tromboze).

Crizele hemolitice severe, infecțiile și trombozele sunt cele mai frecvente cauze de deces. Transformarea în leucemie acută a fost semnalată în cazuri foarte rare (23 de cazuri raportate până în prezent) (35, 37). Cercetări recente (11, 37) au arătat că celulele leucemice derivă din clona HPN și că odată cu debutul LA eritrocitele cu stigmatele HPN diminuează și dispar.

Diagnostic pozitiv. În formele cu tablou clinic caracteristic, diagnosticul este sugerat de anamneză sau de constatarea hemoglobinuriei macroscopice. În formele atipice, diagnosticul poate fi întârziat în lipsa asocierii semnelor de hemoliză cu hemosiderinurie, pancitopenie și deficit de fier.

Diagnosticul HPN trebuie luat în considerare ori de câte ori se ivește una din următoarele situații neobișnuite: 1) anemie hemolitică fără o cauză evidentă; 2) carență de fier fără etiologie clară; 3) orice pancitopenie însoțită de hemoliză, indiferent de celularitatea măduvei osoase; 4) la bolnavii cu tromboze repetate, cefalalgii sau cu accese dureroase abdominale și lombare inexplicabile; 5) la subiecții care fac accidente hemolitice posttransfuzionale fără evidență de izoimunizare.

Principalele etape ale diagnosticului sunt: a) recunoașterea procesului de hemoliză cronică; b) evidențierea semnelor de hemoliză intravasculară; c) efectuarea testelor serologice specifice (tabelul 28.I).

Diagnosticul diferențial se poate face cu celelalte tipuri de hemoglobinurii, cu alte anemii hemolitice, cu anemia Biermer, cu anemia diseritropoietică congenitală tip II sau cu anemiile aplastice. O atenție deosebită trebuie acordată diagnosticului diferențial dintre abdomenul acut chirurgical și tromboza vaselor abdominale profunde sau cea a venei hepatice.

Transfuziile cu eritrocite spălate constituie metoda de elecție a trade aspectul evolutiv al bolii. Se recomandă o abținere de la tratament la bolnavii aflați în stare de echilibru, la care hemoliza este redusă cu sau fără anemie asociată. Recomandări pentru prevenirea crizelor de hemoglobinurie macroscopică nu pot fi prescrise decât la rarele cazuri la care pot fi decelați factorii precipitanți. În celelalte cazuri se urmărește corectarea anemiei, diminuarea procesului hemolitic, oprirea crizelor de hemoglobinuire, tratarea complicațiilor. Nici una din aceste metode nu elimină complet semnele bolii.

Transfuziile cu eritrocite spălate constituie metoda de elecție a tratamentului anemiei. În plus, ele reduc intensitatea procesului hemolitic și pot opri accesele de hemoglobinurie. Transfuziile cu sânge integral sunt contraindicate, întrucât plasma administrată poate conține cantități de C′ activ sau izoanticorpi care activează C′ bolnavului. Unele reacții febrile sau puseuri de hemoliză posttransfuzională ar putea fi induse de leucoaglutinine apărute în serul bolnavilor politransfuzați (17).

Androgenii pot induce creșterea eritropoiezei și/sau o diminuare a procesului hemolitic de bază, cu toate că tulburarea fundamentală a bolii rămâne neinfluențată. Nevoia de transfuzii se reduce, accesele de hemoglobinurie se rărese, iar infecțiile sunt mai bine tolerate. Cel mai util preparat este Fluoximesteronul. Doza de atac este de 60 mg/zi, timp de o lună cel puțin, iar dozele de întreținere sunt de 10—30 mg/zi. Tratamentul se continuă pe perioade lungi. Efectele secundare sunt minime. Oprirea bruscă a tratamentului este urmată adesea de hemoglobinurie (17).

Feroterapia poate declanșa crize hemolitice prin stimularea producției de eritrocite tinere, mai sensibile la acțiunea C′. S-a sugerat că dacă se deprimă producția de reticulocite transfuzând bolnavul concomitent cu administrarea perorală de fier, crizele de hemoglobinurie pot fi prevenite.

Corticoizii sunt indicați la pacienții la care se constată pozitivarea testului Coombs sau în cazurile rebele la celelalte tratamente. Se recomandă Prednisonul în doze de atac de 40 mg/zi, cel puțin două săptămâni, urmate, în cazurile cu răspuns favorabil, de un tratament de întreținere de lungă durată, cu doze zilnice de 5—10 mg. Dozele de seară ar putea preveni accesele de hemoliză nocturnă (33).

Alte proceduri terapeutice, ca drenajul biliar sau administrarea de acid folic, sunt comune celorlalte anemii hemolitice cronice.

Soluțiile de dextran cu greutate moleculară 72 000 sau 142 000 pot controla accesul de hemoglobinurie și pot reduce temporar procesul hemolitic prin mecanisme necunoscute. Se folosesc, de regulă, 500—1 000 ml din soluția 6%. Administrarea repetată sau pe termen lung poate fi urmată de complicații hemoragice sau anafilactice (43).

Hidratarea perorală este indicată în toate cazurile de hemoglobinurie manifestă, pentru menținerea diurezei și prevenirea insuficienței renale.

Pentru tratamentul complicațiilor trombotice se recomandă în general folosirea anticoagulantelor, după schemele obișnuite.

Unii autori recomandă în acest scop preparatele cumarinice deoarece s-a semnalat riscul accentuării hemolizei după doze moderate de heparină (23). Complicațiile grave provocate prin trombozarea unor trunchiuri venoase mari pot fi rapid înlăturate prin administrarea locală (prin cateter) de streptokinază sau urokinază (38).

Infecțiile se combat cât mai precoce și mai energic, după principiile obișnuite. Tratamentul antiinfecțios nu influențează evoluția hemoglobinuriei deja instalate.

Splenectomia poate fi luată în discuție numai la bolnavi cu splenomegalie importantă și semne de hipersplenism.

O terapie de perspectivă, cu intenție curativă, este transplantul de măduvă osoasă care, încercat într-un număr de cazuri, a dat rezultate promițătoare (1).

Durata de viață a bolnavilor cu HPN a crescut în ultimul timp la 14,6 ani în medie, ca urmare a progreselor făcute în tratamentul accidentelor trombotice și a infecțiilor. Prognosticul este influențat de proporția de eritrocite sensibile la C', în funcție de care oscilează frecvența complicațiilor majore ale bolii.

BIBLIOGRAFIE

1. ANTIN J. H., GINSBURG D. și colab.: Blood 1985; 66: 1247.
2. AMRIS C. J., HANSEN N. E.: Acta Med. Scand. 1968; 184: 551.
3. AUDITERE J. V., HARTMANN R. C. și colab.: Arch. Pathol. 1960; 69: 534.
4. BEUTLER E.: În WILLIAMS W. J., BEUTLER E., ERSLEV A. J., LICHTMAN M. A. (eds.): Hematology; McGraw Book Comp., New York, 1990, 188.
5. CARMEL R. și colab.: New Engl. J. Med. 1970; 283: 1329.
6. CHOW F. L. și colab.: Blood 1985; 66: 940.
7. COLIȚĂ D. și colab.: Zilele Medicale ale Spitalului Fundeni, București, 13—14.XII.1985.
8. CRADDOCK P. R. și colab.: Blood 1976; 47: 931.
9. DACIE J. V.: Proc. Congr. Intern. Soc. Hematol., New York, 1968.
10. DAVITZ M. A. și colab.: J. Exp. Med. 1986; 163: 1150.
11. DAVINE D. V. și colab.: J. Clin. Invest. 1987; 79: 314.
12. DIXON R. N., ROSSE W. F.: J. Clin. Invest. 1977; 59: 360.
13. DOKTER M. E., MORRISON M.: Blood 1986; 67: 540.
14. DUSTIN M. L. și colab.: Nature 1987; 329: 846.
15. GARDNER F. H., MURPHY S.: Ser. Haematol. 1972; 5: 78.
16. GÖTZE O., MÜLLER-EBERHARD H. J.: New Engl. J. Med. 1972; 286: 180.
17. HARTMANN R. C., KELHOUSE J. F.: Ser. Haematol. 1972; 5: 42.
18. HÄNSCH G. M. și colab.: J. Clin. Invest. 1980; 80: 7.
19. HOLGUIN M. H. și colab.: J. Clin. Invest. 1989; 84: 7.
20. JOST A., COLIȚĂ A., URSEA C., COLIȚĂ D. și colab.: Doc. Haemat. 1973; 1: 67.
21. KUE C., VAN VOOLEN G. A., MORRISON A. N.: Blood 1972; 40: 875.
22. LEWIS S. M., DACIE J. V.: Brit. J. Haemat. 1967; 13: 236.
23. LOGUE G. L.: Blood 1977; 50: 239.
24. NICHOLSON-WELLER A. și colab.: Proc. Nat. Acad. Sci. 1983; 80: 5066.

25. NICHOLSON-WELLER A., SPICER D. B., ANSTEN K. F.: New Engl. J. Med. 1985; 312: 1091.
26. OKADA N. şi colab.: Int. Immunol. 1989; 1: 205.
27. OKADA N.. şi colab.: Clin. Exp. Immunol. 1990; 80: 109.
28. ONI S. B., OSUNKOYA B. O., LUZZATTE L.: Blood 1970; 36: 145.
29. PARKER C. J. şi colab.: J. Clin. Invest. 1984; 73: 1130.
30. ROBERTS W. L. şi colab.: Proc. Natl. Acad. Sci. 1987; 84: 7817.
31. ROITT J. M.: Essential Immunology, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1989, cap. 1 şi 2.
32. ROSSE E. F., ADAMS J. P., THORPE A. M.: Br. J. Haematol. 1974; 28: 81.
33. ROSSE W. F.: Clin. Haematol. 1978; 7: 541.
34. ROSSE W. F.: West J. Med. 1980; 132: 219.
35. ROTOLI B., LUZZATTO L.: Clin. Haematol. 1989; 2: 113.
36. SALAMA A. şi colab.: Br. J. Haematol. 1988; 38: 11.
37. SHICHISHIMA T. şi colab.: Blood 1993; 81: 1855.
37a. SCHUBERT J. şi colab.: Immunol. To Day 1994; 15: 299.
38. SHOLAR P. W., BELL W. R.: Ann. Intern. Med. 1985; 103: 539.
39. STERN M., ROSSE W. F.: Blood 1979; 53: 928.
40. SUGITA Y. şi colab.: J. Biochem. (Tokyo) 1988; 104: 633.
41. SULTAN C., MARQUET M., JOFFREY Y.: Ann. Med. Int. 1974; 125: 599.
42. VAN DER WEYDEN M. B., FIRKIN B. G.: Ser. Haemat. 1972; 5: 61.
43. WINTROBE M. W. şi colab.: Clinical Hematology. Edit. Lea Febiger, Philadelphia, 1981, 978.
44. YAMASHIDA M. şi colab.: New Engl. J. Med. 1990; 323: 1184.
45. ZALMAN L. S. şi colab.: J. Exp. Med. 1987; 165: 572.

XXIX

HEMOGLOBINOPATIILE

C. PREDESCU

Definiţie. Hemoglobinopatiile* sunt boli ereditare în care leziunea fundamentală afectează rata de sinteză sau structura globinei din hemoglobina normală. Clinic hemoglobinopatiile se manifestă cel mai obişnuit sub formă de anemie hemolitică şi, mai rar, de cianoză sau poliglobulie. Ele se deosebesc de „hemoglobinopatiile dobândite", în care de obicei alterarea hemoglobinei se datoreşte acţiunii unor substanţe toxice, cum sunt methemoglobinemiile.

Hemoglobinopatiile se pot împărţi în două mari grupe: primul grup, *hemoglobinopatiile calitative*, include pe cele în care anomalia sau mutaţia genetică duce la sinteza unei hemoglobine anormale din punct de vedere chimic; al doilea grup, *hemoglobinopatiile cantitative*, cuprinde sindroamele talasemice, caracterizate prin blocarea parţială sau totală a ratei de sinteză a unuia sau mai multor lanţuri polipeptidice ale globinei. Ele variază mult ca gravitate, de la anomalii de laborator asimptomatice până la sindroame sau afecţiuni cu sfârşit letal în uter sau în prima copilărie.

Istoric. Istoricul cunoştinţelor despre hemoglobinopatii este marcat de două date memorabile: anul 1925, în care Cooley şi Lee au descris primele cazuri de talasemie majoră, maladie care ulterior avea să fie cunoscută sub denumirea de boală Cooley, şi anul 1949, în care Pauling descrie prima Hb anormală, HbS, ca tulburare fundamentală a drepanocitozei.

Ţinând seama de aceste două date importante, evoluţia cunoştinţelor despre hemoglobinopatii poate fi împărţită în trei perioade: perioada dinaintea anului 1925, perioada dintre 1925 şi 1949 şi perioada de după 1949.

Înaintea anului 1925, hemoglobinopatiile erau înglobate în termenul general de „anemie pseudoleucemică a copilului", descrisă de Von Jaksch în 1889. Merită menţionat că, încă din 1866, Körber a arătat că Hb din sângele cordonului ombilical este mai rezistentă la denaturarea cu alcali decât Hb din sângele de adult.

* Bibliografia la capitolul Methemoglobinemiile.

După descrierea lui Cooley și Lee, boala este recunoscută și de medicii din țările ei de origine, Italia și Grecia. Întreaga perioadă dintre 1925 și 1948 este marcată de o serie de lucrări, apărute atât în literatura americană, cât și în cea italiană, care aveau să definească tot mai bine manifestările clinice, modificările hematologice, precum și carcterul ereditar al bolii. Este perioada în care se introduce termenul de „talasemie", precum și noțiunile de heterozigot, homozigot, talasemie minoră și talasemie majoră.

După 1949, anul descrierii primei Hb anormale și, totodată anul introducerii conceptului de „boală cu leziuni la nivel molecular", urmează o perioadă caracterizată printr-o adevărată explozie de studii și cercetări legate de structura, sinteza și genetica hemoglobinelor normale și patologice. Tehnicile de investigare se perfecționează și apar tehnici noi, de mare finețe, numărul hemoglobinelor anormale descoperite crește vertiginos, iar studiile de incidență, efectuate în diverse zone geografice ale lumii, duc la cunoașterea tot mai completă a răspândirii lor pe plan mondial.

Răspândire geografică. Majoritatea Hb anormale nu au o incidență crescută pe plan mondial, ele fiind diagnosticate la un număr limitat de cazuri, în diverse zone ale lumii.

Există însă în afara diverselor tipuri de talasemie, care reprezintă hemoglobinopatia cu cea mai mare incidență pe plan mondial, câteva Hb anormale cu răspândire mare în anumite zone geografice, fapt ce constituie adevărate probleme medico-sociale pentru țările din aceste regiuni. În acest grup intră: HbS (Africa ecuatorială, sudul Indiei, Ceylon, Madagascar, populația de origine africană din cele două Americi); HbC (Africa de Vest), HbD Punjab (Nordul Indiei); HbE și HbQ (Peninsula Indochineză); Hb Lepore (Bazinul Mediteranean) (6, 23). Frecvența hemoglobinopatiilor este mai mare în zonele cu malarie endemică.

În țara noastră, hemoglobinopatiile au o incidență relativ scăzută în raport cu incidența găsită în unele zone geografice sau grupuri populaționale din lume.

Studiile populaționale efectuate în sudul țării (13, 16) și în Moldova (29) au arătat că β-talasemia este hemoglobinopatia cu cea mai mare răspândire, incidența medie fiind de 0,5%. Hemoglobinopatiile cauzate de Hb anormale sunt relativ rar întâlnite, cel mai frecvent fiind diagnosticate în ordine Hb Lepore, variantele HbA_2 (fără răsunet clinic), HbS, HbO Arabia etc. În tabelul 29.I sunt redate cazurile de Hb anormale diagnosticate în Laboratorul de hemoglobinopatii de la Institutul de Hematologie București.

Genetica și bazele moleculare ale hemoglobinopatiilor. Sinteza diverselor lanțuri polipeptidice ce intră în componența globinei se desfășoară sub control genetic după schema generală de sinteză a proteinelor. Mesajul genetic cuprins în secvența nucleotidică a ADN cromosomial este transmis prin intermediul ARNm la nivel ribosomal și redat în secvența aminoacidică a lanțului polipeptidic. Fiecare lanț polipeptidic ce intră în componența hemoglobinelor fiziologice este reprezentat la nivelul ADN cromosomial printr-o genă specifică, notată cu numele lanțului respectiv. Există astfel 6 gene structurale (ξ, ε, α, γ, δ și β), corespunzătoare celor 6 lanțuri polipeptidice din Hb fiziologice umane, care asigură controlul genetic al structurii primare a acestora.

În prezent, este unanim admis că genele pentru Hb sunt situate pe două perechi de cromosomi autosomali, și anume: pe perechea de cromosomi 16 sunt situate genele ξ și genele α, iar pe perechea de cromo-

TABELUL 29.1

Hemoglobine anormale diagnosticate în România

Hemoglobină	Familii	Cazuri
Hb Lepore	61	146
Variante de Hb A_2*	37	45
Hb S	17	57
Hb O Arabia	6	15
Hb D Punjab	5	8
Hb M Iwate	3	5
Hb I Broussais	1	5
Hb Hasharon	1	2
Hb Bucureşti	1	2
Hb rapidă**	2	4

* din care 1 caz tipizat ca Hb NYU $\alpha_2\delta_2$ 12 Asn → Lys

** netipizate

somi 11 sunt localizate genele non-alfa, adică ε, G_γ, A_γ, δ şi β. La normal, genele α sunt duplicate, existând astfel două perechi identice de gene α, care au acelaşi ritm de sinteză şi care dau naştere la un singur tip de lanţuri α. Pentru lanţurile γ există de asemenea două perechi de gene structurale:o pereche de gene G_γ şi o pereche de gene A_γ, care asigură controlul genetic al sintezei celor două tipuri de lanţuri ce poartă aceeaşi denumire, G_γ şi A_γ şi care diferă între ele prin aminoacidul din poziţia 136, şi anume: glicină în catenele G şi alanină în catenele A_γ. Lanţurilor δ şi β le corespunde câte o pereche de gene structurale localizate pe perechea de cromosomi 11, situate foarte aproape unele de celelalte. Lucrările de cartare genetică au pus în evidenţă în apropierea genelor structurale amintite, atât pe cromosomul 16, cât şi pe cromosomul 11 (fig. XXIX.1), structuri nucleotidice asemănătoare genelor structurale ce au fost denumite pseudogene, al căror rol şi semnificaţie nu sunt încă complet elucidate ele fiind însă nefuncţionale. Este posibil ca de-a lungul evoluţiei, acestea pseudogene să fi suferit, în anumite regiuni esenţiale, mutaţii care să le fi făcut nefuncţionale (23, 31, 32).

Cum organismul uman este un organism diploid, genele identice de pe cei doi cromosomi omologi ai perechilor 16 și 11 sunt gene alele. Totalitatea lor reprezintă genotipul pentru hemoglobină, care poate fi exprimat astfel: $\frac{\zeta, \varepsilon, \alpha, \alpha, G\gamma, A\gamma, \delta, \beta}{\zeta, \varepsilon, \alpha, \alpha, G\gamma, A\gamma, \delta, \beta}$, el fiind în fond zestrea genetică a individului moștenită de la cei doi părinți. În cursul dezvoltării ontogenetice a organismului, genotipul rămâne în mod normal neschimbat, chiar dacă în cursul diferențierii și specializării celulare pentru o anumită funcție unele gene rămân nefuncționale. Expresia fenotipică însă este variabilă cu dezvoltarea organismului de la stadiul de ou la adult,

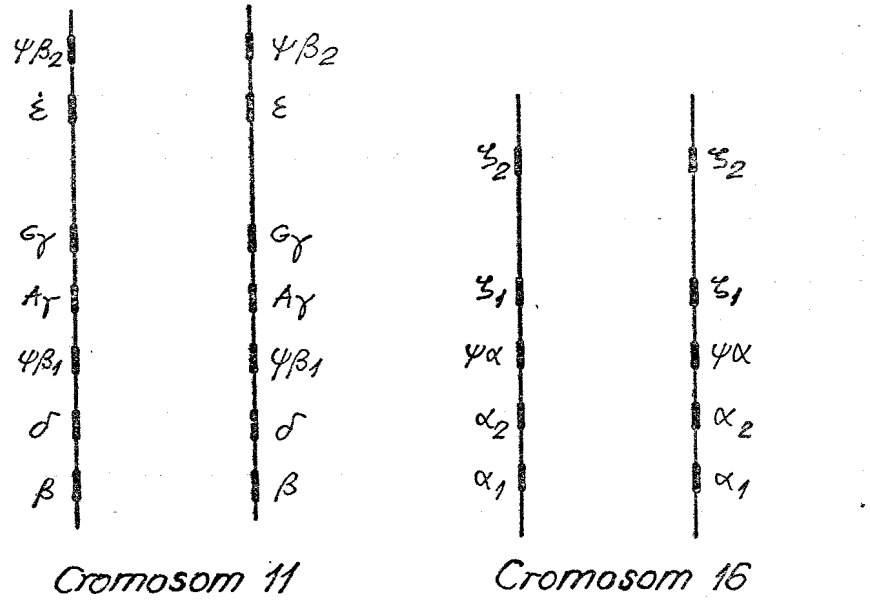


Fig. XXIX.1. — Localizarea pe cromosomi a genelor pentru globină ($\psi\alpha$ și $\psi\beta$ = pseudogene).

și acest fapt este evident și în cazul hemoglobinelor; începutului vieții embrionare îi sunt caracteristice hemoglobinele Gower 1, Portland și Gower 2, care sunt repede înlocuite de HbF, ce va domina întreaga perioadă fetală. Sinteza HbF, care la naștere este predominantă (60—80%), scade în primele luni de viață postnatală, fiind la rândul ei înlocuită de hemoglobinele adulte A și A_2 (fig. XXIX.2). Această variabilitate în expresia fenotipică realizează o adevărată „embriogeneză biochimică" ce se află sub controlul unui sistem reglator complex, insuficient cunoscut încă în prezent. Acest sistem reglator realizează represia parțială sau totală a anumitor gene structurale în anumite perioade ale dezvoltării, lăsând liberă numai funcția acelora care sunt necesare în perioada respectivă.

Există puține date certe privind mecanismul de control la nivel cromosomial al sintezei de proteine la organismele superioare. Modelul de tip „operon", descris de Jacob și Monod (1961) la microorganisme, nu poate fi transpus în totalitate la organismele superioare, unde în reglarea

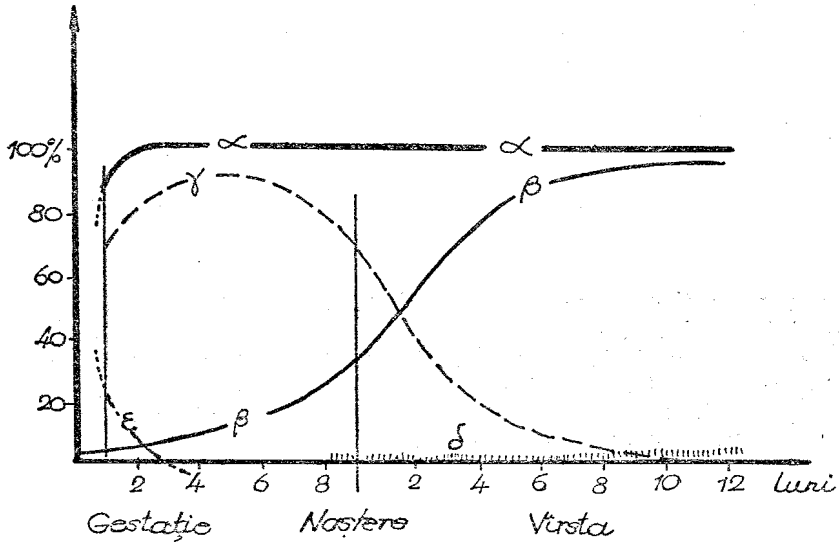


Fig. XXIX.2. — Dezvoltarea și evoluția lanțurilor hemoglobinelor fiziologice umane (adaptat după Huehns și colab., 1964).

cantității și timpului de sinteză al proteinelor se pare că intervin și alți factori reglatori încă necunoscuți (fig. XXIX.3).

Mesajul genetic este conținut în secvența de nucleotide ale lanțului de ADN de la nivelul genelor structurale și este transmis la nivel ribosomal prin intermediul ARNm, care prezintă ca structură imaginea în oglindă a ADN copiat, cu mențiunea că în locul timidinei din ADN, în ARNm se găsește uracil.

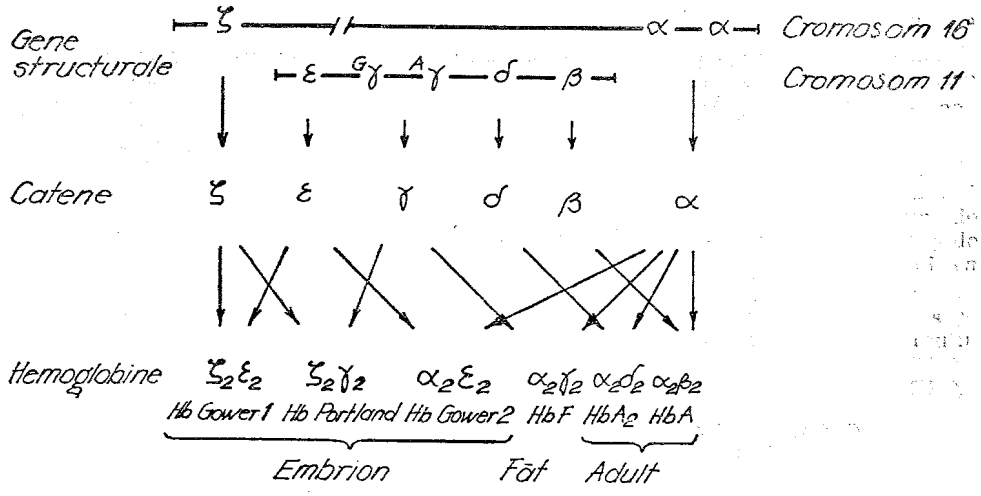


Fig. XXIX.3. — Controlul genetic al sintezei hemoglobinei umane.

Codul genetic este universal la toate speciile de organisme și este un cod triplet. Fiecare secvență succesivă de trei nucleotide din ARNm, respectiv din genele structurate localizate pe ADN, formează un codon și specifică un aminoacid. Cum există 64 de combinații posibile (64 de codoni posibili) ale celor patru nucleotide din ARNm, înseamnă că fiecare din cei 20 de aminoacizi este codificat de mai mult decât de un singur codon (31, 32).

Codul triplet nu este suprapus, fiecare nucleotid putând face parte dintr-un singur codon; cu alte cuvinte, doi codoni vecini nu pot împărți un nucleotid.

Pentru ca fiecare genă să specifice întotdeauna aceeași secvență aminoacidică există „secvențe nucleotidice de inițiere", care determină inițierea decodificării la un anumit punct. Terminarea decodificării unei anumite proteine este realizată prin existența a trei codoni „nonsens" — UAA, UAG și UGA — care codifică „stop" sau terminarea lanțului proteic, ei necodificând nici un aminoacid.

TABELUL 29.II

Codul genetic ARNm

Alanină	Arginină	A. aspartic	Asparagină	Cisteină
GCU	CGU	GAU	AAU	UGU
GCC	CGC	GAC	AAC	UGC
GCA	CGA			
GCG	CGG			
	AGA			
	AGG			
A. glutamic	Glutamină	Glicină	Histidină	Izoleucină
GAA	CAA	CGU	CAU	ADU
GAG	CAG	GGC	CAC	AUC
		GGA		AUA
		GGG		
Leucină	Lizină	Metionină	Fenilalanină	Prolină
UUA	AAA	AUG	UUU	CCU
UUG	AAG		UUC	CCC
CUU				CCA
CUC				CCG
CUA				
CUG				
Serină	Treonină	Triptofan	Tirozină	Valină
UCU	ACU	UGG	UAU	GUU
UCC	ACC		UAC	GUC
UCA	ACA			GUA
UCG	ACG			GUG
AGU				
AGC				
		Codoni speciali		
	Codon de inițiere		Codoni Stop	
	AUG		UAA	
			UAG	
			UGA	

În ultimii ani s-au făcut mari progrese privind structura și organizarea genelor structurale α și β, cât și în regiunile ADN-ului din imediata vecinătate a acestor gene.

Ținând seama că lanțul polipeptidic α conține 141 aminoacizi, iar lanțurile polipeptidice β (precum și δ și γ) 146 aminoacizi și cum un codon este format din trei nucleotizi, lungimea genelor structurale pentru aceste lanțuri polipeptidice ar trebui să fie de 429 și respectiv 444 de nucleotizi în ARNm (incluzând și codonii de inițiere și terminație). În realitate s-a dovedit că ARNm pentru globină este mult mai lung, conținând aproximativ 650 și respectiv 670 de nucleotizi. Cercetările efectuate prin tehnici noi de investigare au arătat că atât în ADN, cât și în ARNm pentru globină există structuri nucleotidice speciale care nu sunt redate în proteină și al căror rol nu este încă bine cunoscut în totalitate.

În prezent este admis că genele structurale sunt formate din trei regiuni de secvențe nucleotidice care sunt redate în secvența proteică, numite *exoni*, despărțite între ele prin două regiuni nucleotidice neredate în secvența proteică, numite *introni*. Rolul și funcția intronilor nu sunt în prezent bine elucidate, dar regiunea de joncțiune dintre introni și exoni se pare că este foarte importantă pentru funcția ARNm pentru globină.

Lungimea intronilor ar fi de 100 și respectiv 850 de perechi de baze și cei 2 introni ar fi situați între codonii 31 și 32 și respectiv 99 și 100 ai genelor structurale.

Este cunoscut că ADN are o structură helicoidală bicatenară, cele două catene fiind unite între ele prin intermediul perechilor de baze complementare, respectiv A—T și G—C. Extremitatea 5′ a unei catene corespunde astfel extremității 3′ a celei de-a doua catene complementare în structura helixului bicatenar.

Transcripția ARNm primar (HnARNm), în care rolul important îl are ARN-polimeraza II, realizează copierea catenei de ADN 3′—5′ progresând de la extremitatea 3′ spre extremitatea 5′ a acestei catene, astfel că HnARNm (ARN heterogen) este identic ca structură nucleotidică cu catena de ADN 5′—3′ (ce nu participă la transcripție), cu diferența că T din ADN este înlocuită cu U în HnARNm. Din această cauză catena 5′—3′ de ADN, care nu participă în transcripție, este numită catena „de codificare" sau catenă cu „sens", în timp ce catena complementară 3′—5′ de ADN (de pe care se face transcripția) este numită catenă „necodificabilă" (noncoding) sau catenă „antisens".

În ceea ce privește structurile nucleotidice necodificabile situate în regiunile ambelor extremități ale genelor pentru globină, cercetări din ultimii ani, bazate pe tehnici de biologie moleculară, au adus date importante privind organizarea genelor, transcripția ARNm, treptele intermediare ale „maturării" acestuia, cu rol în expresia și funcția normală a genei.

La extremitatea 3′ a catenei de ADN, în regiunea de inițiere a transcripției (promotor), pe o lungime de aproximativ 200 de perechi de baze în amonte (*upstream*) de locul de start al transcripției (CAP *site*), au fost puse în evidență structuri nucleotidice cu rol în funcția normală a genei.

Una din aceste secvențe numită „TATA *box*" este o structură stabilă, bogată în adenină și timină și este situată la aproximativ 25—30

perechi de baze de la locul de start al transcripției. Această structură ar avea un rol important în determinarea poziției de start a transcripției. Structura TATA, ce conține aproximativ 50 de perechi de baze pentru gena β globinică, deși este transcrisă, în cursul maturării HnARNm este eliminată și nu participă la translație.

O a doua structură stabilă situată mai departe spre extremitatea 3′ a ADN este denumită „CAT *box*" sau „CCAAT", formată din câteva zeci de perechi de baze, urmată mai departe spre extremitatea 3′ a ADN de o a treia structură denumită CACCC. Mutații genetice intervenite la nivelul acestor structuri duc la o reducere importantă a nivelului transcripției. Astfel de mutații intervenite la nivelul structurilor TATA și CACCC au fost puse în evidență și la unii subiecți cu β-talasemie.

În afara structurilor din regiunea promotorului descrise mai sus, există secvențe cu rol de activatori ai transcripției, care pot fi situate la distanțe mai mari de gena propriu-zisă, pe catena de ADN. Astfel pentru gena β-globinică a fost descris un activator situat pe ADN spre extremitatea 5′, dincolo de zona corespunzătoare segmentului Poly-A. Mutații intervenite la acest nivel pot afecta nivelul transcripției și sinteza normală de proteină.

O altă achiziție recentă este cea referitoare la eliminarea secvențelor necodificabile ale ADN, după terminarea transcripției și cu deosebire la eliminarea secvențelor nucleotidice ce intră în componența celor doi introni, în scopul „maturării" HnARNm și formării ARNm funcțional.

Reacția de scindare (*splicing*) a intronilor este controlată de structuri speciale din ADN, existente la ambele extremități 5′ și 3′ ale graniței dintre introni și exoni. La extremitatea 5′ aceste secvențe sunt formate din nouă nucleotide, dintre care două — dinucleotidul GT — este esențial și comun diverselor gene. Secvențele extremității 3′ conțin aproximativ 12 nucleotide, dintre care de asemenea două sunt absolut necesare pentru o scindare normală, și anume — dinucleotidul AG, aflat la granița intron/exon. Eliminarea corectă a intronilor și joncțiunea exonilor este esențială pentru maturarea și funcția ARNm matur. Mutații intervenite la nivelul regiunilor de *splicing (splice sites)* duc la reducerea formării ARNm funcțional pentru β-globină (ca și pentru alte gene). În unele cazuri de β-talasemie au fost puse în evidență mutații care afectează aceste structuri, ceea ce explică impasul ce intervine în sinteza de lanțuri β din structura globinei.

La extremitatea 3′ a ARNm se află de asemenea o structură de aproximativ 130 nucleotide, după regiunea de codificare, ce este în parte clivată și eliminată, proces urmat de alipirea segmentului poly-A (cu o lungime de aproximativ 50—70 nucleotide) la o anumită distanță de codonul stop, segment ce ar avea rol în stabilitatea ARNm matur și transportul lui în citoplasmă.

Primul produs al transcripției (HnARNm) și maturarea acestuia include adăugarea structurii „CAP" la extremitatea 5′ a HnARNm, eliminarea intronilor, clivajul regiunii necodificabile de la extremitatea 3′ și alipirea segmentului poly-A. Astfel ARNm matur și funcțional trece din nucleu în citoplasmă, unde se leagă de ribosomi și începe procesul de translație, segmentul poly-A fiind și el clivat și neredat în proteină.

Cele peste 500 Hb anormale cunoscute până în prezent au la bază leziuni genetice intervenite la nivelul genelor structurale ale Hb. Leziunea genetică (tabelul 29.III) modifică secvența normală nucleotidică a genei, respectiv mesajul genetic, fapt ce se reflectă în structura lanțului polipeptidic corespunzător (30).

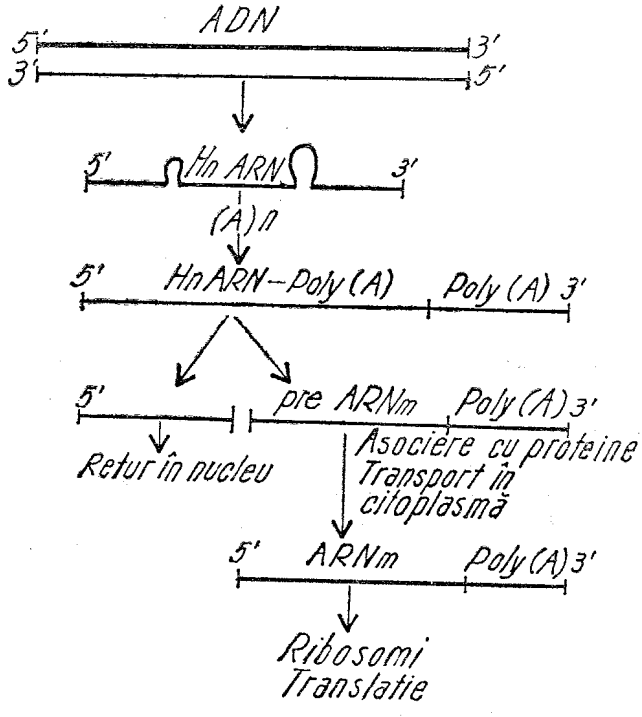


Fig. XXIX.4. — Reprezentarea schematică a biogenezei ARNm.

Majoritatea Hb anormale diferă de Hb normală prin înlocuirea unui singur aminoacid într-unul din lanțurile polipeptidice ale globinei (doi aminoacizi pentru întreaga moleculă). Această modificare are la bază o mutație de tip punctiform.

În acest tip de mutație, un nucleotid dintr-un codon din ADN este înlocuit prin altul, ceea ce va face ca acest codon să nu mai codifice aminoacidul inițial, ci un altul corespunzător noului codon. Exemplu, cazul HbS: în codonul al 6-lea al genei structurale *beta* există în mod normal CTC, respectiv GAG în ARNm, cea ce codifică acid glutamic; în mutația de tip S, acest codon devine CAC, respectiv GUG în ARNm, care specifică valină, caracteristică pentru poziția a 6-a a lanțului β al HbS:

Hb	ADN	ARNm	lanț	β6
HbA	CTC	GAG	Glu	
HbS	CAC	GUG	Val	

TABELUL 29.III

Leziunile genetice din hemoglobinele anormale
(după International Hemoglobin Information Center, Georgia, S.U.A., 1991)

MUTAȚII PUNCTIFORME	
variante de catene α	162
variante de catene β	288
variante de catene δ	20
variante de catene γ	62
FUZIUNE DE GENE (catene)	9
DELEȚII	13
INSERȚII	3
DELEȚII/INSERȚII	3
ADIȚIE (C terminal)	4
EXTENSIE (N terminal)	4
FRAMESHIFT	3
DOUĂ MUTAȚII PE ACEEAȘI GENĂ (catenă)	15
TOTAL	586

Dacă acest tip de mutație intervine la nivelul unei singure gene structurale beta, subiectul este un heterozigot pentru mutația de tip S. El va avea o genă anormală beta^S și o genă normală beta^A, ceea ce se va reflecta în sinteza de Hb prin două Hb: HbS ($\alpha_2^A \beta_2^S$) și respectiv HbA ($\alpha_2^A \beta_2^A$).

Genotipul unui astfel de subiect se va exprima: $\frac{\alpha^A \beta^S}{\alpha^A \beta^A}$, iar fenotipul va fi Hb AS. În cazul homozigotului, ambele gene structurale β poartă mutația de tip S. Un asemenea subiect nu posedă deloc Hb A normală, întreaga sa Hb fiind reprezentată de Hb anormală S. Genotipul homozigotului este $\frac{\alpha^A \beta^S}{\alpha^A \beta^S}$, iar fenotipul Hb SS.

De-a lungul genei structurale beta, la nivelul codonilor care codifică cei 146 aminoacizi (pe o lungime de 3×146 nucleotide), pot intervenii mutații asemănătoare care stau la baza numeroaselor Hb anormale cu modificare structurală pe lanțul β (HbC, HbE etc.).

Genele structurale α asigură structura primară a catenelor α. Ca și pentru gena β, și la nivelul genei α pot interveni mutații punctiforme multiple ce vor condiționa sinteza de lanțuri polipeptidice α anormale. Exemplu: în cazul HbI, în poziția 16 a lanțului α lizina este substituită prin acid glutamic. HbI se va scrie $\alpha_2^I \beta_2^A$ sau $\alpha_2^{16Lys \rightarrow Glu} \beta_2^A$.

La heterozigoți, fenotipul Hb AI corespunde genotipului $\frac{\alpha^I \beta^A}{\alpha^A \beta^A}$, iar la homozigoți, fenotipul Hb II corespunde genotipului $\frac{\alpha^I \beta^A}{\alpha^I \beta^A}$.

Mutații asemănătoare stau la baza tuturor hemoglobinelor anormale caracterizate printr-o modificare structurală a catenelor alfa (HbK, HbQ etc.).

Și la nivelul genelor structurale δ și γ pot interveni mutații asemănătoare. Genele structurale δ asigură controlul genetic al lanțurilor δ din Hb A_2 ($\alpha_2^A \delta_2^{A_2}$).

Mutațiile genetice ale genei structurale δ stau la baza variantelor de Hb A_2 descrise până în prezent, caracterizate prin modificarea structurală a lanțurilor δ. Variantele de HbF cunoscute, caracterizate prin catene γ anormale sunt consecința mutațiilor intervenite la nivelul genelor structurale γ.

În afara Hb anormale care au la bază o mutație genetică de tip punctiform, există alte Hb anormale explicate prin leziuni genetice de altă natură, și anume:

a) *deleția:* unul sau mai mulți codoni dintr-o genă structurală lipsesc, ceea ce se traduce printr-un lanț polipeptidic în care lipsesc aminoacizii corespunzători.

Exemplu: Hb Gun Hill: $\alpha_2^A \beta_2^{91-95 \rightarrow 0}$

Hb Freiburg: $\alpha_2^A \beta_2^{23 Val \rightarrow 0}$

b) *fuziunea de gene* ce apare ca urmare a unui *crossing-over* anormal, duce la sinteza de lanțuri polipeptidice anormale. În acest grup intră Hb Lepore [$\alpha_2(\delta\beta)_2$], în care lanțurile non-α au o structură la capătul N terminal identică cu lanțul δ ce se continuă de la un anumit nivel, spre capătul C terminal, cu o structură identică lanțului β. Gena Lepore este provenită din fuziunea genelor δ și β în urma unui *crossing-over* anormal. Același mecanism explică structura din hemoglobinele anti-Lepore [Hb P Congo, Hb P Nilotic și Hb Miyada ($\alpha_2/\beta\delta/_2$] și Hb Kenya [$\alpha_2(\gamma\beta)_2$], fuziune de gene γ și β (6, 7, 23).

c) *adiția* este leziunea genetică care explică formarea Hb anormale cu lanțuri polipeptidice alungite. În Hb Constant Spring (CS) lanțurile α conțin 172 aminoacizi, adică 141+31. Leziunea genetică intervine la nivelul codonului 142 care ar trebui să codifice „stop" (terminarea lanțului). Prin mutație punctiformă acesta devine din condon „non sens" codon cu „sens" codificând glutamină, iar sinteza lanțului continuă până în poziția 173, unde întâlnește un nou codon „stop" funcțional. Același mecanism stă la baza anomaliei structurale din Hb Icaria și Koya Dora (catena α=172 aminoacizi). În Hb Wayne (catenele α au 146 aminoacizi), Hb Saverne (catene β=156 aminoacizi) și Hb Cranston (catene β au 157 aminoacizi), adiția are la bază o mutație de tip *frameshift* (6, 7, 23).

d) *imperecherea anormală* de catene structural normale explică structura Hb H (β_4) și Hb Bart's (γ_4).

În ceea ce privește transmiterea ereditară, diversele Hb anormale se transmit după model autosomal codominant nelegat de sex.

Într-un cuplu „părinte normal+părinte heterozigot" pentru o anomalie, 50% din descendenți vor fi normali și 50% vor fi heterozigoți pentru anomalia respectivă (fig. XXIX.5). Într-un cuplu în care ambii părinți sunt heterozigoți pentru aceeași anomalie, 25% din descendenți vor fi normali, 25% homozigoți și 50% heterozigoți pentru anomalia în cauză.

Ambele sexe sunt afectate în egală măsură. Exprimarea fenotipică este de tip codominant, aceasta însemnând că la heterozigoți, ambele alele, atât cea normală cât și cea patologică, dau naștere la sinteză de proteine, ceea ce se traduce fenotipic prin existența în eritrocite a ambelor hemoglobine, Hb normală și Hb patologică.

În prezent, odată cu dezvoltarea tehnicilor de investigare, noțiunile clasice de „recesiv" și „dominant" au în domeniul hemoglobinopatiilor un înțeles relativ. Spre exemplu, heterozigotul pentru HbS nu prezintă semne clinice de boală și boala era considerată recesivă. Electroforeza de Hb arată însă că și cromosomul afectat se manifesta fenotipic, aproximativ 40—45% din Hb fiind Hb S. În același sens Hb M și Hb instabile se manifestă clinic, uneori sub formă severă de boală în stadiul de heterozigot și nu se cunosc forme homozigote pentru aceste hemoglobine anormale, ele fiind nefuncționale. Chiar și unele forme de β-talasemie heterozigotă se manifestă ca anemie hemolitică de gravitate medie. Aceste fapte ne fac să credem că cel puțin pentru hemoglobinopatii termenul de „codominant" este mai potrivit, ambii cromosomi exprimându-se fenotipic.

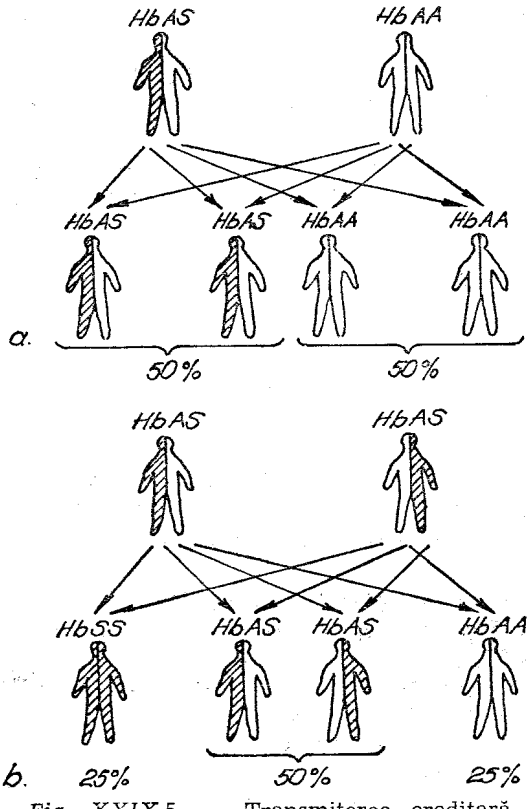


Fig. XXIX.5. — Transmiterea ereditară a hemoglobinopatiilor.
a) un părinte heterozigot + celălalt părinte normal; b) ambii părinți heterozigoți.

Nomenclatură. Inițial Hb normale și patologice au fost desemnate cu literele mari ale alfabetului: Hb normală de la adult a fost denumită HbA, iar Hb fetală HbF. Litera B a fost atribuită unei variante de HbA_2, denumită HbB_2, iar litera S primei Hb anormale, descrisă de Paulin în siclemie. Celelalte Hb anormale descrise au primit literele C, D, E etc., până la litera Q (7).

Cum numărul Hb anormale depășește cu mult literele alfabetului s-a convenit ulterior ca noile Hb anormale descoperite să fie denumite cu numele localității în care au fost descrise, notându-se anomalia structurală (exemplu: Hb Zürich β^{63} His→Arg sau Hb Torino α^{43} Phe→Val).

Fiziopatologia hemoglobinopatiilor. Diversele modificări structurale din Hb anormale influențează în mod diferit proprietățile fizicochimice,

stabilitatea și funcția Hb. Aceasta ține, în mare parte, de natura modificării structurale și de nivelul anomaliei în edificiul tridimensional al moleculei de Hb.

Multe dintre Hb anormale nu se traduc prin semne clinice de boală, întrucât modificarea biochimică localizată într-o regiune „neesențială" a moleculei influențează numai în mică măsură sau deloc stabilitatea și funcția Hb.

Înlocuirea unui aminoacid într-o anumită regiune „critică" a unuia din lanțuri poate însă altera integritatea și funcția întregii molecule, cu răsunet clinic ce reflectă, în foarte mare măsură, anomalia structurală.

În general, modificările structurale intervenite la suprafața moleculei nu influențează proprietățile Hb și sunt lipsite de urmări clinice. Totuși, în această categorie intră câteva Hb a căror modificare structurală alterează profund proprietățile fizice ale moleculei de Hb, realizând pe plan clinic anemii hemolitice grave: HbS este unul din exemple. În aceasta, schimbările în configurația spațială a lanțului β^s, în forma dezoxigenată, duc la formarea de legături intermoleculare cu lanțurile α din moleculele vecine, ce constituie baza agregatelor de Hb și a siclizării hematiilor. HbC constituie un alt exemplu din această categorie: solubilitatea scăzută a HbC este cauza deformării eritrocitare.

Legăturile intercatenare au importanță deosebită în menținerea stabilității Hb și funcției normale de transport a O_2. Anomalii structurale intervenite la nivelul contactului α_1 β_1 duc la pierderea integrității moleculare și la anemie hemolitică (exemplu: Hb Tacoma, Hb Philly). Obișnuit, anomaliile structurale intervenite în interiorul moleculei și în special în anumite regiuni „critice", ce caracterizează majoritatea hemoglobinelor instabile, duc la instabilitate moleculară, precipitarea subunităților hemoglobinice în eritrocit, formare de corpi Heinz și hemoliză. Legăturile de la nivelul lanțurilor α_1 β_2 intervin în menținerea fenomenului de interacțiune „hem-hem" și în funcția de transport a O_2. Anomaliile structurale intervenite la acest nivel modifică afinitatea pentru O_2 a Hb și funcția respiratorie a acesteia: Hb Capetown, Hb Chesapeake (7, 12).

Substituirile de aminoacizi la nivelul legării hemului de globină au ca urmare formarea de legături stabile între aminoacidul „anormal" și Fe din hem, cu transformarea Fe^{2+} în Fe^{3+} și methemoglobinemie.

Modificările lanțului globinic α care este prezent în hemoglobinele A, A_2 și F produc anomalii ale acestor hemoglobine. Aceste α-hemoglobinopatii provoacă simptome atât în cursul gestației cât și după naștere, deoarece funcția genei α globinei este necesară tot timpul spre deosebire de β hemoglobinopatii în care copiii sunt de obicei asimptomatici până la luna a 3-a—a 9-a când se formează Hb A.

În rezumat, se poate afirma că: a) diversele Hb anormale cunoscute până în prezent pot realiza, din punct de vedere clinic, câteva sindroame importante, și anume: anemie hemolitică, cianoză ereditară, policitemie familială, sindroame asemănătoare sindromului talasemic; b) aspectele clinice sunt în strânsă relație cu natura și nivelul anomaliei structurale în structura spațială complexă a moleculei de Hb.

Clasificarea patogenică a hemoglobinopatiilor structurale este redată în tabelul 29.IV.

TABELUL 29.IV

Clasificarea patogenică a hemoglobinopatiilor structurale

	Tablou clinic	Hemoglobina	Nivelul anomaliei structurale	Consecința anomaliei structurale
I	Hemoglobinopatii asociate cu Anemie hemolitică	HbS, HbC, HbE	Exteriorul moleculei	Deformarea eritrocitului
		Hb Zurich Hb Köln Hb Hammersmith	Buzunarul hemului	Instabilitatea hemoglobinei
		Hb Tacoma Hb Philly	Contact $\alpha_1\beta_1$	Formarea de corpi Heinz
		Hb Gun Hill Hb Freiburg	Configurația spațială a catenelor globinei	
II	Hemoglobinopatii asociate cu Methemoglobinemie ereditară	Hb — inele M	Legarea hemului de globină	Methemoglobinizare
III	Hemoglobinopatii asociate cu Policitemie familială	Hb Chesapeake Hb Capetown Hb Yakima	Contact $\alpha_1\beta_2$ Locul de legare a 2—3 DPG	Creșterea afinității pentru O_2
IV	Hemoglobinopatii asociate cu Anemie hemolitică + cianoză	Hb Kansas	Contact $\alpha_1\beta_2$	Scăderea afinității pentru O_2
V	Hemoglobinopatii asociate cu tablou clinic de sindrom talasemic	Hb Lepore Hb Constant Spring Hb Icaria Hb Koya-Dora	Fuziune de gene. Hemoglobine cu catene alungite	Reducerea ratei de sinteză a hemoglobinei

Diagnosticul de hemoglobinopatie este sugerat de anamneză (boală care evoluează încă din copilărie, prezența acelorași semne și la alți membri ai familiei), semne fizice (icter sau subicter, splenomegalie, cianoză etc.) și examene curente de laborator (care pun în evidență anemia, semnele de hemoliză, modificările morfologice ale eritrocitelor etc.).

Examenul clinic și hematologic trebuie completat cu examene speciale, capabile să evidențieze anomalia hemoglobinică. Unele dintre ele sunt tehnici simple ce pot fi executate în orice laborator clinic cu dotare tehnică obișnuită, și anume: testul de siclizare, determinarea Hb alca-

linorezistentă, coloraţia pentru corpi Heinz, testul de stabilitate termică etc. Electroforeza de Hb este tehnica de bază în diagnosticul hemoglobinopatiilor cu toate limitele ei (Hb anormale cu migrare asemănătoare Hb A, cazuri de β şi α talasemie cu electroforeză normală etc.).

Tehnica de *„fingerprint"* şi analiza de aminoacizi, care permit precizarea anomaliei structurale, se execută în laboratoare specializate. Investigaţiile familiale ajută diagnosticul şi precizează modul de transmitere ereditară.

Interpretarea rezultatelor obţinute prin toate aceste tehnici cere experienţă şi ea trebuie făcută de specialistul hematolog în coroborare cu examenul clinic şi hematologic complet al bolnavului.

Evoluţie şi prognostic. Formele heterozigote au în general un prognostic bun şi sunt compatibile cu o viaţă aproape normală, cu excepţia unor cazuri de talasemie care pot îmbrăca aspecte de anemie hemolitică severă, chiar şi în forma heterozigotă. Formele homozigote de drepanocitoză şi talasemie au, obişnuit, un prognostic sever şi numai puţine cazuri ating vârsta adultă. Homozigoţii pentru Hb C, E şi D îmbracă, de regulă, evoluţia unei anemii hemolitice de gravitate medie.

Tratament. Ca boli genetice, hemoglobinopatiile sunt afecţiuni încă incurabile, care nu beneficiază decât de tratamentul simptomatic al tulburărilor cauzate de leziunea genetică şi de complicaţiile ce apar în cursul evoluţiei cronice.

Transplantul de măduvă, deşi nu poate fi considerat încă o terapie la alegere, a dat rezultate încurajatoare în special în boala Cooley (8).

Ingineria genetică, teoretic posibilă, rămâne o speranţă a viitorului.

Transmiterea ereditară a acestor boli impune măsuri de profilaxie, în scopul limitării răspândirii caracterelor genetice deficitare, specifice acestor maladii. Sfatul genetic trebuie să se axeze pe explicarea naturii bolii şi pe riscul de a avea descendenţi afectaţi.

SICLEMIA SAU HEMOGLOBINOPATIA S

Sinonime: drepanocitoza, anemia falciformă, anemia cu hematii în seceră, hemoglobinoza S.

Siclemia este o hemoglobinopatie calitativă în care tulburarea de bază este reprezentată de prezenţa în eritrocite a HbS.

Boala se caracterizează prin anemie hemolitică cronică şi fenomene ocluzive vasculare, cauzate de transformarea drepanocitară a eritrocitelor.

Istoric. Prima descriere a fenomenului de siclizare a fost făcută de J. P. Herrich în 1910, care semnalează forma bizară în „seceră" a hematiilor din sângele unui pacient negru, cu anemie. Ulterior s-a observat că siclizarea apare numai în condiţiile scăderii tensiunii de O_2.

În 1949, Neel şi Beet aduc dovada transmiterii ereditare a maladiei şi că forma gravă reprezintă starea de homozigot, iar forma uşoară de tară, starea de heterozigot. În acelaşi an, Janet Watson sugerează că boala este cauzată de prezenţa unui alt tip de Hb decât cea de la adultul normal. Descoperirea Hb S, prima Hb anormală, avea să fie meritul lui Pauling şi al colaboratorilor săi care, în 1949, dovedesc că Hb din sângele pacienţilor cu anemie cu hematii în seceră are o altă migrare electroforetică, decât Hb normală.

Precizarea anomaliei structurale a HbS este adusă de Ingram în 1956, prin introducerea tehnicii „*fingerprint*".

Descoperirea primei Hb anormale, HbS, a marcat nu numai o nouă etapă în evoluția cunoștințelor despre hemoglobinopatii, dar și o piatră de hotar pe drumul cercetării medicale a secolului XX, prin fundamentarea concepției generale cu privire la bolile moleculare.

Etapa clinică de înțelegere a bolii dinaintea anului 1949, este completată ulterior cu cunoașterea mecanismului intim fiziopatologic, bazat pe noile cunoștințe despre structură și anomaliile Hb. S-a demonstrat astfel că o boală clinică complexă, cum este siclemia, este rezultatul unei anomalii moleculare, a unei singure proteine, și anume înlocuirea unui singur aminoacid prin altul din molecula hemoglobinei.

Răspândire geografică. Boala are incidență maximă la popoarele din zona ecuatorială a continentului african, precum și în Peninsula Arabică, sudul Indiei, Ceylon, Madagascar și populația de culoare din cele două Americi. În Europa, focare de HbS au fost descrise în Turcia, Grecia și sudul Italiei (7, 22, 27, 28). La celelalte popoare europene diagnosticul de HbS este o raritate. În țara noastră, primele cazuri de HbS au fost comunicate în 1967 (4, 5, 18) și în prezent, în evidența Institutului de Hematologie sunt 17 familii (totalizând 57 de cazuri) cu această anomalie genetică. Dintre acestea, 2 cazuri au fost homozigoți, 11 asociere HbS+talasemia β, 1 caz asociere HbS+Hb Lepore, iar restul heterozigoți.

HbS conferă un oarecare grad de rezistență împotriva malariei provocată de *Plasmodium falciparum*. Această caracteristică este unul din factorii care explică incidența mare a siclemiei în zonele infestate cu acest parazit și îndeosebi în Africa ecuatorială: subiecții normali (AA) au o mortalitate mare prin malarie, subiecții cu siclemie (SS) au o mortalitate ridicată prin însăși gravitatea bolii, iar subiecții heterozigoți (AS) sunt rezistenți la malarie și au o supraviețuire normală (6, 23).

Etiopatogenie și fiziopatologie. Siclemia este o boală moleculară cauzată de o mutație genetică, intervenită la nivelul genelor care controlează sinteza Hb și se transmite autosomal nelegat de sex.

În eritrocitele umane, Hb se găsește într-o concentrație mare, sub forma unui fluid vâscos, la limita stării de transformare paracristalină.

Formele oxigenate ale HbA și HbS au aceeași solubilitate. În timpul trecerii de la forma oxigenată la forma redusă, solubilitatea HbA scade la jumătate, în timp ce aceea a HbS se reduce de aproximativ 50 de ori, luând aspectul unui gel semisolid, cu formarea unor cristale alungite, filamentoase, numite „tactoizi" (termen tehnic folosit pentru cristalele unidimensionale) foarte asemănătoare hematiilor în seceră, obținute cu ajutorul testului de siclizare. Mecanismul acestei modificări nu este complet cunoscut. Lucrările lui Perutz arată că înlocuirea acidului glutamic prin valină în poziția a 6-a a lanțurilor β din HbS (β^6 Glu→Val) produce, în cursul dezoxigenării, alterarea configurației spațiale a lanțurilor β, ceea ce favorizează stabilirea de legături cu lanțurile α din moleculele vecine și apariția de filamente și agregate de Hb.

Concentrația HbS în eritrocite este factorul determinant în producerea fenomenului de siclizare care constă în modificarea în formă de seceră a eritrocitului. Concentrații mai mici de 40% din totalul Hb nu dau naștere la modificări eritrocitare decât în condiții deosebite ale scăderii O_2. În plus, hematiile cu concentrație mai mare de HbS au o afinitate scăzută

față de O_2, ceea ce favorizează menținerea în această formă a hematiilor siclizate odată formate (fig. XXIX.6.)

HbF ce însoțește HbS la unii homozigoți nu participă la formarea de agregate hemoglobinice, având astfel rol protector asupra hematiilor.

Modificările în structura și proprietățile fizicochimice ale HbS, care stau la baza fenomenului de siclizare, explică fiziopatologia celor două sindroame importante din siclemie: hemoliza și trombozele vasculare.*

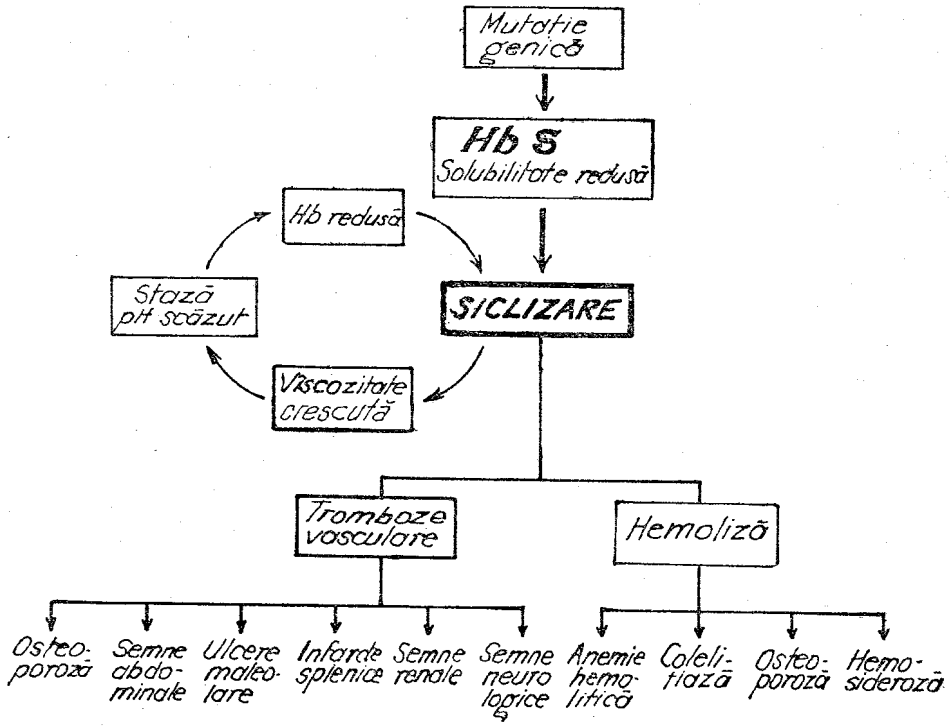


Fig. XXIX.6. — Fiziopatologia siclemiei.

Prezența HbS în eritrocite și schimbările alternative ale acesteia de la forma redusă la forma oxigenată provocată tot atâtea cicluri de siclizare și desiclizare a eritrocitelor cu consecințe negative asupra permeabilității și integrității membranei celulare. În plus, s-a demonstrat că fragilitatea mecanică este crescută chiar la tensiuni de O_2 superioare celei necesare producerii transformării drepanocitare, precum și faptul că eritrocitele siclizate au o rigiditate crescută, care nu le permite trecerea prin capilare cu un diametru mai mic de 5 μ. În acest fel, alterările de la nivelul membranei și sechestrarea continuă a eritrocitelor în capilarele splenice și hepatice constituie cauzele care explică scurtarea duratei de viață a hematiilor și întreținerea hemolizei cronice.

Trombozele vasculare, cel de-a doilea sindrom major din siclemie, sunt, ca și hemoliza, consecința transformării drepanocitare a eritrocite-

* Există și alte Hb cu tendința la siclizare: C. Harlem, Alexandra, C. Georgetown, Bart's, I. Memphis, Porto Alegre.

lor. Urmarea directă a fenomenului de siclizare este creşterea vâscozităţii sângelui, care duce la încetinirea vitezei de circulaţie, mai ales în vasele mici, cu apariţia fenomenului de „*sludge*" (aşezarea în fişicuri a eritrocitelor). Staza sanguină are ca urmare o creştere a acidozei prin trecerea în sânge a unor cantităţi mai mari de metaboliţi acizi tisulari. Staza şi acidoza accentuează dezoxigenarea Hb, iar aceasta, la rândul ei, favorizează siclizarea. Cu cât staza şi acidoza sunt mai accentuate, cu atât este mai favorizată siclizarea; cu cât siclizarea este mai accentuată, cu atât este mai mare vâscozitatea sângelui şi sunt create condiţii mai favorabile pentru stază şi acidoză. Apare astfel un adevărat cerc vicios în care participă mai mulţi factori, fiecare din ei fiind, în acelaşi timp, cauza şi consecinţa celorlalţi.

Tablou clinic. Starea de heterozigot este obişnuit lipsită de semne clinice, purtătorii fiind cel mai adesea diagnosticaţi întâmplător, cu ocazia altor afecţiuni sau a investigaţiilor familiale. Totuşi, în condiţii speciale de hipoxie (zboruri la înălţime mare cu avioane nepresurizate sau în timpul administrării anesteziei, sau după stresuri fizice mari pot apărea crize de tromboze vasculare cu infarcte în diverse organe, uneori chiar cu sfârşit letal. De asemenea, la purtătorii de HbS se observă o incidenţă crescută a hematuriei.

Siclemia forma homozigotă este obişnuit o anemie hemolitică gravă, cei mai mulţi bolnavi neatingând vârsta adultă.

Debutul bolii este insidios, primele simptome apar cam la sfârşitul lunii a 3-a sau în a doua jumătate a primului an de viaţă, când în mod normal sinteza de HbS înlocuieşte aproape în totalitate HbF. Primele semne care atrag atenţia sunt paloarea, astenia, inapetenţa, întârzierea în dezvoltare, la care se pot adăuga destul de frecvent dureri osoase localizate la nivelul membrelor superioare şi inferioare. Examenul obiectiv în această perioadă descoperă în plus splenomegalie şi un uşor icter conjunctival.

Boala evoluează ca o anemie hemolitică cronică cu perioade de exacerbare, adevărate crize hemolitice. Pe măsură ce boala evoluează, copilul capătă aşa-numitul *sickle habitus* caracterizat prin trunchi mic, braţe şi picioare lungi, cifoză dorsală, lordoză lombară şi modificări craniene cu proeminenţa boselor frontale.

Manifestările clinice cele mai importante pot fi împărţite în două mari grupe, în raport cu cele două sindroame importante: sindromul hemolitic şi trombozele vasculare (7, 21, 26, 27).

Din prima grupă fac parte icterul, splenomegalia, insuficienţa cardiacă, litiaza biliară şi osteoporoza. *Icterul* este variabil în raport cu gradul de hemoliză şi perioadele de exacerbare a acestora şi are caracterele icterului hemolitic. *Splenomegalia,* prezentă de regulă din prima copilărie, poate avea dimensiuni moderate în perioadele de hemoliză cronică sau creşte mult în perioadele de crize cu sechestrarea splenică rapidă şi masivă de eritrocite siclizate. Odată cu înaintarea în vârstă şi cu evoluţia bolii, infarctele splenice repetate duc la dispariţia splenomegaliei şi la realizarea unei adevărate autosplenectomii prin fibroză şi atrofie. O creştere moderată a ficatului poate fi prezentă. *Afectarea cardiacă* este comună, începând cu perioada celei de-a doua copilării şi se datoreşte suferinţei cronice a muşchiului cardiac produsă de anoxie, microinfarcte

miocardice, depunerea de fier la acest nivel. Dilatarea globală a cordului, apariția de sufluri orificiale și tulburările de ritm se întâlnesc frecvent și adesea sunt puse pe seama unei etiologii reumatismale. La bolnavii cu o evoluție mai lungă pot apărea semne de cord pulmonar, generat de infarcte pulmonare multiple sau de frecvente bronhopneumonii. *Litiaza biliară pigmentară* întâlnită la circa 1/3 din bolnavi și *osteoporoza* fac parte obișnuit din tabloul anemiilor hemolitice cronice. Osteoporoza este generalizată, dar la radiografie apare mai evidentă la nivelul corpurilor vertebrale unde, în unele cazuri, se pot observa tasări sau chiar prăbușiri de corpuri vertebrale. Aspectul de „craniu în perie" cu îngroșarea diploei și osteoporoză este frecvent întâlnită în siclemie. Se mai pot întâlni dureri la presiunea oaselor, tumefieri articulare, tumefacții ale mâinilor și picioarelor (sindrom mână-picior), dactilită siclemică.

Semnele clinice din a doua grupă, cauzate de trombozele vasculare, apar cel mai adesea în crize și prezintă o mare variabilitate datorită faptului că orice organ poate fi practic afectat. *Infarctele osoase* se manifestă prin dureri vii la nivelul extremităților în perioada primei copilării și sunt mai frecvente la nivelul coloanei vertebrale și pelvisului, la vârstele mai mari. Adesea se pot complica cu fracturi spontane, necroze osoase sau osteomielită. *Infarctul pulmonar* este cel mai frecvent la vârsta adultă, gravitatea și intensitatea semnelor clinice fiind în funcție de mărimea vasului trombozat; el poate fi cauza unei bronhopneumonii. *Crizele abdominale* uneori pot fi pasagere, cu dureri abdominale însoțite de vărsături; alteori însă infarctele mezenterice, intestinale sau splenice pot îmbrăca tabloul clinic de abdomen acut, cu febră și semne de șoc. *Tulburările neurologice* sunt din cele mai variate și în raport cu teritoriul afectat de blocarea circulației, mergând de la forma ușoară de iritabilitate până la convulsii, paralizii de nervi cranieni sau comă. Una din cele mai dramatice manifestări neurologice este cecitatea bruscă, care numai uneori se poate remite. *Manifestările renale* sunt cauzate de repetate leziuni intra- și extravasculare de la nivelul rinichiului, care duc în timp la o insuficiență renală progresivă. Hematuria și hipostenuria sunt semnele cele mai frecvente. Uneori poate apărea priapism. *Ulcerele cronice maleolare* se întâlnesc mai ales la bolnavii adolescenți și la adulți. Ele sunt rezultatul trombozelor vasculare locale favorizate de staza și anoxia tisulară de la acest nivel.

Manifestările clinice din această grupă pot apărea brusc fără nici o cauză aparentă, alteori însă sunt favorizate de infecții intercurente și agravate de deshidratare, stază circulatorie, hipoxie și acidoză. Diversitatea tablourilor clinice pe care le pot îmbrăca crizele acute provocate de trombozele vasculare, simulând diverse boli, face ca diagnosticul clinic în timpul crizei să fie deosebit de dificil, mai ales în regiunile unde siclemia nu este o boală frecventă. Nu este surprinzător faptul că siclemia a fost denumită „marele mimetism".

Examenele de laborator la subiecții cu formă de tară dau rezultate în cadrul limitelor normale, cu excepția testului de siclizare și a electroforezei Hb. Pe un număr de 43 de cazuri aflate în evidența noastră, Hb a fost între 11 și 14 g/100 ml sânge, Ht a variat între 38 și 44%, iar numărul de reticulocite a fost normal. La homozigoți există întotdeauna un

grad marcat de *anemie* cu cifre de 5—10 g/100 ml sânge pentru Hb şi de 20—30% pentru Ht, cu o scădere corespunzătoare a numărului de hematii. *Reticulocitele* sunt constant crescute între 5 şi 25%, oglindind reacţia internă regenerativă medulară. *Frotiul de sânge periferic* pune în evidenţă importante modificări de mărime, formă şi culoare a hematiilor. Majoritatea hematiilor sunt uşor macrocitare, cu hipocromie moderată, apărând ca hematii „în ţintă", alături de care se pot observa hematii normocrome, mai ales la cazurile cu valori uşor scăzute ale Hb. Anomaliile de formă se traduc prin prezenţa de hematii colţuroase, hematii alungite sau cu prelungiri ascuţite, schizocite. Prezenţa de hematii „în ţintă" şi hematii cu corpi Jolly traduce în parte gradul de hiposplenism realizat de frecventele infarcte splenice. Policromatofilia, prezenţa de eritroblaşti şi hematiile cu punctuaţii bazofile completează tabloul frotiului de sânge periferic. Cu toată concentrarea mare de HbS din hematii (80—90%), numai la puţine cazuri se pot vedea pe frotiu hematii în seceră (drepanocite), care sugerează diagnosticul (fig.XXIX.7). *Leucocitele şi trombocitele* depăşesc în mod constant valorile normale şi numai la cazurile cu splenomegalie importantă şi hipersplenism pot fi găsite valori scăzute faţă de normal. În timpul crizelor acute, leucocitele pot ajunge la cifre de 20 000—30 000, cu deviere la stângă până la mielocit. VSH este obişnuit scăzută, mai ales dacă sângele este recoltat cu stază, datorită capacităţii scăzute a hematiilor „în seceră" de a forma rulouri. *Rezistenţa osmotică* a hematiilor este crescută, iar rezistenţa mecanică scăzută. *Sideremia* este constant crescută sau foarte crescută, valori între 150 şi 200 μg/100 ml fiind normal întâlnite. Coloraţia pentru hemosiderină medulară pune în evidenţă gradul mare de încărcare cu fier a organismului, mai ales la bolnavii care au primit transfuzii repetate. *Bilirubinemia* variază cu intensitatea hemolizei, valorile bilirubinei indirecte depăşind de regulă normalul. La bolnavii cu afectare hepatică atât bilirubina indirectă, cât şi cea directă sunt crescute în ser. *Examenul de urină* oglindeşte suferinţa renală (hematuria, hipostenuria cu D=1 010 sunt aproape constante) şi hemoliza cronică (urobilinogenul crescut sau foarte crescut). *Examenul măduvei osoase* nu este necesar pentru diagnostic. Atunci când se face, el arată o măduvă hipercelulară cu predominanţa seriei eritrocitare şi inversarea raportului G/E.

Testul de siclizare este pozitiv, procentul de hematii în seceră şi rapiditatea pozitivării testului fiind direct legate de cantitatea de HbS conţinută de eritrocite*. La purtătorii de tară (heterozigoţi), testul este pozitiv de regulă după 1—2 ore de incubare, iar proporţia hematiilor în seceră de 40—50%, în timp ce pozitivarea testului la homozigoţi apare în câteva minute de la preparare şi aproape toate hematiile sunt transformate drepanocitar.

Electroforeza Hb confirmă diagnosticul, punând în evidenţă Hb anormală. La heterozigoţi, HbS este obişnuit în proporţie de 25—45%, HbA_2 este normală, iar restul este reprezentat de HbA. La homozigoţi, aproape toată Hb este reprezentată de HbS, alături de care se pot găsi cantităţi

* În prezenţa metabisulfitului de sodiu, cu rol de agent reductor, HbS din eritrocite cristalizează şi acestea iau forma de hematii în seceră.

reduse de HbF confirmate prin testul de denaturare la alcali. Investigațiile familiale sunt necesare pentru diferențierea homozigoților de HbS de cazurile dublu heterozigote (HbS+Th; HbS+HbD) (fig. XXIX.8).

Diagnostic pozitiv și diferențial. Dificultatea stabilirii diagnosticului de siclemie ține, în primul rând de forma clinică a bolii cu care se prezintă bolnavul în momentul examinării.

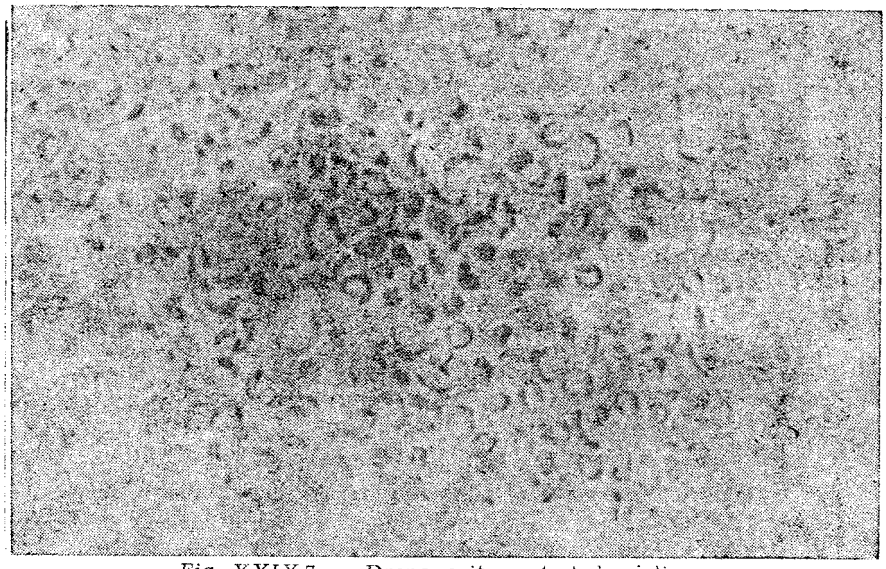


Fig. XXIX.7. — Drepanocite — test de siclizare.

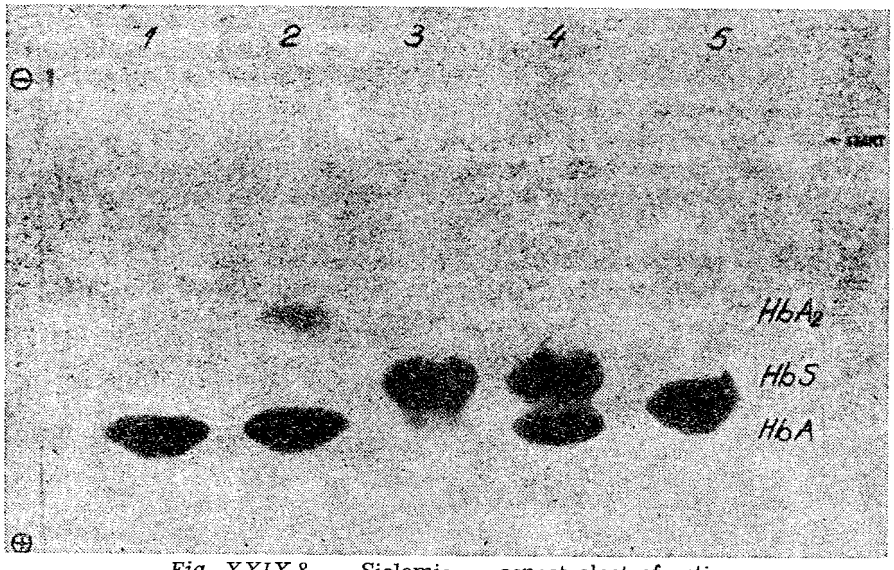


Fig. XXIX.8. — Siclemie — aspect electroforetic.
Nr. 1 = normal; nr. 2 = β-talasemie minoră; nr. 3 = asociere HbS+β-talasemie; nr. 4 = HbS heterozigot; nr. 5 = sânge de cordon.

Diagnosticul clinic în timpul crizelor trombotice este deosebit de dificil, mai ales în zonele în care boala nu este frecvent întâlnită. Nu trebuie uitat însă că boala poate apărea oriunde și la oricare din populațiile globului. Cele mai frecvente erori de diagnostic sunt: abdomen acut, care poate duce la intervenția chirurgicală, reumatism, diverse boli neurologice sau osoase. Absența splenomegaliei, mai ales în cazurile de vârstă mai avansată, mărește și mai mult confuzia în această situație.

Stabilirea diagnosticului în perioada de hemoliză este mult mai ușoară. Icterul sau subicterul și semnele generale de hemoliză evidențiate prin investigațiile curente de laborator, stabilesc diagnosticul de anemie hemolitică. Istoricul bolii și prezența acelorași semne și la alți membri ai familiei duc la presupunerea de anemie hemolitică ereditară. Aspectul morfologic al hematiilor, chiar în absența hematiilor în seceră, sugerează diagnosticul de hemoglobinopatie și îndreaptă investigațiile în această direcție, iar testul de siclizare și electroforeza Hb îl confirmă.

Diagnosticul purtătorilor de tară este relativ ușor atunci când se face în cadrul investigațiilor familiale sau a investigațiilor în masă, care folosesc de obicei teste de specialitate.

În afara acestor situații, diagnosticul este mai dificil întrucât lipsește tabloul clinic și hematologic caracteristic siclemiei-boală.

Evoluție, complicații. Forma de tară — heterozigotă — are o evoluție benignă, compatibilă cu o supraviețuire normală.

Siclemia-boală — forma homozigotă — are o evoluție cronică, progresivă, cu sfârșit letal, obișnuit în prima sau a doua și mai rar în a treia decadă a vieții. Totuși, sunt descrise și forme clinice mai blânde, care pot ajunge la vârste mai înaintate, mai ales în condițiile unei supravegheri medicale corespunzătoare.

Crizele hemolitice apar în cursul evoluției cu frecvență și gravitate variabile, uneori putând fi mortale. Ele pot fi provocate de o tromboză vasculară, de infecții, perfuzii de sânge, alteori însă nu au nici o cauză evidentă. În cursul crizelor pot fi puse în evidență crioglobuline sau aglutinine la rece. Un rol în declanșarea crizelor a fost atribuit unei acidoze metabolice, cu scăderea CO_2, pH-ului și bicarbonatului plasmatic.

Crizele hemolitice au o durată de 5—7 zile și se manifestă cu febră, rahialgii și artralgii, uneori cu dureri abdominale violente și simptome de șoc.

Sarcina reprezintă un risc important matern și fetal: nașterea prin cezariană este recomandată, cu precauțiile corespunzătoare în timpul administrării anesteziei.

Cele mai frecvente cauze de moarte sunt crizele hemolitice acute, trombozele vasculare, insuficiența cardiacă și renală infecțiile intercurente (adesea tuberculoza).

Complicațiile sunt numeroase și variate și pot fi împărțite în: complicații generale, complicații produse de tromboze vasculare și complicații care țin de sindromul hemolitic.

Infecțiile intercurente, în special cu germeni din grupele *Salmonella* și pneumococ sunt frecvente, mai ales la bolnavii cu atrofie splenică sau splenectomizați. Cele mai obișnuite sunt septicemia și osteomielita cu salmonele și meningita pneumococică.

Complicațiile osoase cele mai comune sunt fracturile spontane sau necrozele aseptice. Necrozele aseptice ale capului humeral și în special femural sunt cel mai des întâlnite. Siclemia este cea mai frecventă cauză a osteonecrozei capului femural la copii (8 a). Leziunile vertebrale pot fi urmate de complicații neurologice prin compresie.

Trombozele de la nivelul sistemului nervos central pot fi urmate de sechele diferite, de la alterarea capacității intelectuale și tulburări de vedere (retinopatie proliferativă) de diverse grade, până la hemiplegie. Există, aproape de regulă, un anumit grad de afectare hepatică, care se accentuează cu evoluția bolii și vârsta, provocat de microtromboze intrahepatice. Au fost descrise cazuri letale de necroză hepatică apărute în timpul crizelor trombotice.

Dintre complicațiile produse de hemoliza cronică, cele mai obișnuite sunt: colecistita cronică și colelitiaza, crizele aplastice, carența de acid folic și hemosideroza. Carența de acid folic, în afara tulburărilor hematologice (megaloblastoză), poate cauza întârzieri în dezvoltare. Transfuziile repetate de sânge agravează și mai mult homosideroza cauzată de absorbția crescută de Fe.

Tratament. Ca toate bolile genetice, siclemia nu beneficiază de tratament cauzal. Tratamentul este *simptomatic,* vizând corectarea anemiei și prevenirea complicațiilor, și *profilactic,* urmărind evitarea factorilor care favorizează crizele de siclizare și limitarea transmiterii ereditare a anomaliei genetice.

Transfuzia de masă eritrocitară este indicată în cazurile la care anemia este severă (Hb sub 7 g/100 ml), în crizele aplazice sau în crizele trombotice persistente. În ultima situație, concomitent cu introducerea sângelui normal se poate extrage o cantitate de sânge de la bolnav, în scopul obținerii unei diluții cât mai mari a hematiilor falciforme. În crizele vasoocluzive grave și când există risc de accidente cerebrovasculare sau de priapism, se recomandă exsanguinotransfuzii parțiale de urgență pentru a scădea HbS. Excesul de transfuzii trebuie evitat, având în vedere riscul hepatitei, hemosiderozei și izoimunizării.

În timpul crizelor trombotice se va proceda la încălzirea bolnavului, hidratare, alcalinizare, oxigenoterapie și se vor combate durerile (analgezice) și spasmele vasculare (vasodilatatoare, antispastice). Administrarea pentru perioade scurte de metilprednisolon în doze mari (15 mg/kg i.v. de 2 ori la 24 de ore interval), în caz de dureri violente, a dat rezultate favorabile, dar este încă în curs de studiu (5 a).

Administrarea periodică de acid folic (10—15 mg/zi) este utilă pentru prevenirea deficitului de consum, a megaloblastozei sau crizelor aplazice. Riscul unor complicații severe la copii, produse de infecții cu *Streptococcus pneumoniae* impune administrarea profilactică de penicilină *per os.*

Transplantul de măduvă osoasă a dat în cazuri mai grave rezultate bune până la vindecarea bolii, dar cum este grevat de o mortalitate (10—50%) și o morbiditate mare, acest risc nu este acceptat de majoritatea părinților cu copii bolnavi, astfel că nu a intrat în practică.

Unii autori au arătat că gravitatea siclemiei, ca de altfel și a betatalasemiei poate fi ameliorată prin creșterea producției de Hb fetală, ce se poate obține ca substanțe citotoxice (azacitidină, hidroxiuree), cu fac-

tori de creştere sau cu agenţi inductori ai diferenţierii, cum este butiratul. Toate aceste substanţe nu pot fi însă folosite, din cauza mielotoxicităţii lor. O substanţă cu acţiune similară, dar lipsită de reacţii adverse, Na4-fenilbutiratul, cu metabolitul său activ, Na-fenilacetatul a fost propusă recent în doze, în funcţie de vârstă, între 0,3 şi 0,6 g/kgcorp/zi. Administrarea de eritropoietină recombinată cu suplimentare de fier poate creşte producţia de către hidroxiuree a HbS (19 a).

Splenectomia este indicată numai în cazurile rare, la care splenomegalia se complică cu semne evidente de hipersplenism.

Administrarea de chelatori ai fierului — desferoxamina (Desferal) şi dietilentriamin pentacetat (DTPA) — în doze corespunzătoare gradului de încărcare cu Fe a organismului, poate întârzia apariţia hemosiderozei severe.

Pentru prevenirea crizelor de siclizare s-au încercat diverse metode şi substanţe (alcalinizante, administrate de uree, cianat de Na) care n-au dat rezultate satisfăcătoare.

Purtătorii de tară nu necesită tratament.

Profilactic se recomandă evitarea condiţiilor favorizante declanşării crizelor trombotice: frig, băi reci, administrarea de diuretice sau vasoconstrictoare, zboruri sau ascensiuni la înălţimi mari sau alte condiţii de atmosferă săracă în O_2. În timpul intervenţiilor chirurgicale se va evita hipoxia produsă la administrarea anesteziei. Exsanguinotransfuzii parţiale sunt indicate înainte de anestezii generale, pentru a scădea HbS sub 50% şi riscul unor episoade siclemice grave în cursul unor accidente anestezice sau al unei hipoxii tranzitorii.

Sfatul genetic se axează pe explicarea naturii bolii şi a riscului de a avea copii taraţi. Administrarea de anticoncepţionale şi recomandarea avortului terapeutic în familiile afectate vizează limitarea răspândirii anomaliei genetice.

ALTE HEMOGLOBINE ANORMALE CARE PRODUC HEMOLIZĂ

HEMOGLOBINOPATIA C

HbC ($\alpha_2 \beta_2^6$ Glu→Lys) este a doua Hb anormală descrisă (Itano şi Neel, 1950). Analiza structurală a arătat că ea diferă de HbA prin înlocuirea acidului glutamic din poziţia a 6-a a lanţului β prin lysină (Itano).

Electroforetic, HbC are o migrare foarte lentă la pH 8,6, migrând în aceeaşi poziţie cu HbE şi HbO_{Arabia}, fapt pentru care se presupune că unele cazuri descrise la africani drept HbC, netipizate structural, să fi fost în realitate HbO_{Arabia}. Această presupunere se bazează pe faptul că HbO_{Arabia} se întâlneşte sporadic în unele grupuri populaţionale africane mai frecvent decât se credea iniţial.

Caracteristica principală a HbC este solubilitatea sa scăzută în raport cu HbA. Eritrocitele care conţin cantităţi mari de HbC sunt mai

rigide decât cele normale, ceea ce favorizează sechestrarea lor splenică (6, 7).

Răspândire geografică. Zona de maximă incidență a HbC este localizată în Africa de Vest, ce include Volta Superioară, Ghana și o parte din Nigeria. Incidența variază la diverse grupuri populaționale, situându-se între 14,4 și 28,6% pentru Ghana de Nord (Cabannes). Incidența scade în țările vecine pe măsura îndepărtării de zona de maximă răspândire. La negrii din cele două Americi, incidența a fost găsită între 0,3 și 6,8% în raport cu originea vest-africană a grupelor populaționale investigate (6, 23).

Tablou clinic. Heterozigoții (AC) sau purtătorii de tară sunt asimptomatici, valorile Hb și Ht fiind în limite normale. Pe frotiul de sânge periferic se poate găsi un număr variabil de hematii în țintă. La electroforeza Hb, la pH 8,6 HbC se izolează ca o fracție anormală, cu migrare foarte lentă, pe linia HbA_2, în valori procentuale de 38—44%.

Cazurile homozigote (CC) se manifestă clinic ca anemie hemolitică de gravitate medie sau ușoară, splenomegalia fiind constant prezentă. Anemia este moderată, iar pe frotiul de sânge periferic se remarcă frecvente hematii în țintă ca și prezența în unele eritrocite a unor cristale hemoglobinice de aspect dreptunghiular. La electroforeza Hb, hemoglobina este formată aproape în totalitate din HbC.

Hemoglobina A_2 nu poate fi evaluată, migrând în aceeași poziție cu HbC. Valorile pentru HbF se situează ușor peste valorile normale.

Evoluția cazurilor homozigote este cronică și relativ benignă (26, 27).

HEMOGLOBINOPATIA D

Sub denumirea de HbD se cunosc cel puțin 6 variante structurale diferite, toate având anomalia structurală pe lanțul β (tabelul 29.V).

HbD migrează în pH alcalin în aceeași poziție cu HbS cu care poate fi confundată, dar diferă de aceasta prin mobilitatea diferită de a HbS pe gel de agar la pH 6,2 și prin faptul că testul de siclizare este negativ. HbD a fost descrisă în formă heterozigotă, în formă homozigotă și în asociere cu β-talasemia sau HbS (dublu heterozigotism HbD+β-talasemie sau HbD+HbS).

Răspândire geografică. HbD poate fi considerată o hemoglobină majoră în raport cu răspândirea sa pe plan mondial.

Din cele 6 variante structurale descrise, HbD_{Punjab} are cea mai mare răspândire, celelalte variante fiind descrise sporadic, cu caracter familial.

Cea mai mare incidență a HbD_{Punjab} a fost găsită în nord-vestul Indiei (2%) la populația Sikh și la populația Indu din Punjab (6, 23). Cabannes și colab. găsesc o incidență de 0,3—0,9% în Algeria, iar Chernoff găsește o incidență de 0,4% la negrii nord-americani. În țările europene, HbD a fost descrisă sporadic în Italia, Grecia și Turcia, în familii izolate. În țara noastră, HbD a fost descrisă în 5 familii, totalizând 8 cazuri din care 1 caz a fost o asociere HbD+β-talasemie. În două familii s-a făcut tipizare structurală, hemoglobina anormală fiind de tip D_{Punjab}.

TABELUL 29.V

Variantele structurale ale HbD

	Denumirea	Anomalia structurală	Autorul
1	Hb D Punjab	β^{121} Glu→Gln	Itano (1951) Baglioni (1962)
	Hb D Los Angeles		
	Hb D Cyprus		
	Hb D Portugal	idem	
	Hb D Chicago		
	Hb D North Carolina		
	Hb OaK Ridge		
2	Hb D Ibadan	β^{87} Thr→Lys	Watson, Williams (1965)
3	Hb D Bushman	β^{16} Gly→Arg	Wade şi colab. (1967)
4	Hb D Iran	β^{22} Glu→Gln	Rahbar (1973)
5	Hb D Ouled Rabah	β^{19} Asn→Lys	Elion şi colab. (1973)
6	Hb D Beograd Hb D Camperdown	β^{131} Glu→Val	Efremov şi colab. (1973) Wilkinson (1974)

Tablou clinic. Heterozigoţii pentru HbD sunt complet asimptomatici, iar principalii parametri hematologici se încadrează în limitele normalului. Aceste cazuri sunt de obicei diagnosticate cu ocazia investigaţiilor populaţionale sau a studiilor familiale.

Cazurile homozigote apar clinic şi hematologic ca o formă uşoară de anemie hemolitică, cele câteva cazuri homozigote descrise putând desfăşura o activitate de viaţă aproape de normal. Asocierea HbD cu β-talasemia se manifestă ca o anemie hemolitică uşoară sau de gravitate medie (6).

HEMOGLOBINOPATIA E

HbE este de asemenea o Hb anormală cu largă răspândire. Structura chimică a fost precizată de Hunt şi Ingram (1961), anomalia structurală a HbE fiind situată pe lanţul β: β^{26} Glu → Lys. Electroforetic, ca şi HbC şi HbO, HbE are o migrare foarte lentă, la pH 8,6 situându-se pe linia de migrare a HbA_2.

Răspândire geografică. Incidența maximă a HbE se găsește în zona Asiei de sud-est, cu deosebire în Campuchia, Thailanda, Malaesia și arhipelagul Indoneziei. Frecvența maximă a fost găsită la populațiile Khmeră, Phnohgs și Khas, aceasta ajungând la 28—37%. În Thailanda, frecvența este cuprinsă între 8 și 32% (Na-Nakorn și colab., 1956), în Malaesia este de 5—7% și în Birmania de 15—16%. Incidența scade la chinezi și indieni și HbE este absentă în Nepal și Australia. În Indonezia, frecvența este de asemenea crescută, cifrele situându-se între 2 și 16%. În Orientul Mijlociu cazuri izolate au fost descrise în Turcia, Grecia și Egipt.

Tablou clinic. Heterozigoții sunt purtători sănătoși ai anomaliei hemoglobinice, HbE reprezentând la aceștia 35—45% din Hb totală. Cazurile homozigote se manifestă ca anemie hemolitică ușoară, uneori cu splenomegalie și hematii în formă de țintă pe frotiul de sânge periferic. Unele cazuri au o ușoară eritrocitoză. Diagnosticul este confirmat de electroforeza Hb și de investigarea părinților. La homozigoți, HbE reprezintă aproape 100% din totalul Hb, însoțită de valori peste normal de HbF.

HEMOGLOBINOPATIA O

HbO a fost descrisă, pentru prima dată de Lie-Luan-Eng sub numele de Hb Buginese X (1956) și apoi de Lie Injo Luan Eng și Sadone (1958) în Indonezia. Baglioni și Lehman (1962) au stabilit structura chimică a două tipuri de HbO:

$HbO_{Indonezia} = \alpha_2$ 116 Glu→Lys β_2 și

$HbO_{Arabia} = \alpha_2\ \beta_2$ 121 Glu → Lys.

În 1974, Vettore și colab. au descris o nouă variantă sub denumirea de HbO_{Padua} cu structura α_2 30 Glu → Lys β_2.

În țara noastră au fost diagnosticate până în prezent 6 familii cu HbO_{Arabia} (fig. XXIX.9), totalizând 15 cazuri, din care 3 cazuri asociere HbO+β-talasemie (15).

Răspândire geografică. $HbO_{Indonezia}$ se găsește cu deosebire la populația arhipelagului Indonezia, unde frecvența este de 1‰.

HbO_{Arabia} deși inițial a fost descrisă într-o familie arabă, se găsește și la unele grupuri populaționale africane. Cazuri de HbO_{Arabia} au fost descrise în Sudan, Egipt, precum și la populația de culoare din Statele Unite. În Europa, HbO_{Arabia} a fost găsită sporadic în Bulgaria, România, Ungaria și Belgia (6, 23).

Tablou clinic. Heterozigoții sunt purtători sănătoși de tară, fapt observat și la cele 12 cazuri urmărite de noi. Cazurile dublu heterozigote HbO_{Arabia}+β-talasemie îmbracă aspectul clinic de anemie hemolitică de gravitate medie cu splenomegalie importantă. Pe frotiul de sânge periferic se găsesc de regulă frecvente hematii în țintă.

La heterozigoți, HbO reprezintă 31—41% din Hb totală, restul fiind format de HbA. Cazurile de asociere HbO_{Arabia} +β-talasemie sunt cazuri interactive, la care majoritatea Hb este formată din Hb anormală: 2 din cazurile urmărite de noi au avut 75,60% și respectiv 77,40% HbO,

însoțite de valori crescute de HbF (17,50 respectiv 4,5%), restul fiind reprezentat de HbA.

Evoluția acestor cazuri este cronică, cu tendința de agravare și complicații: litiază biliară și hipersplenism hematologic la cazurile cu splenomegalie importantă.

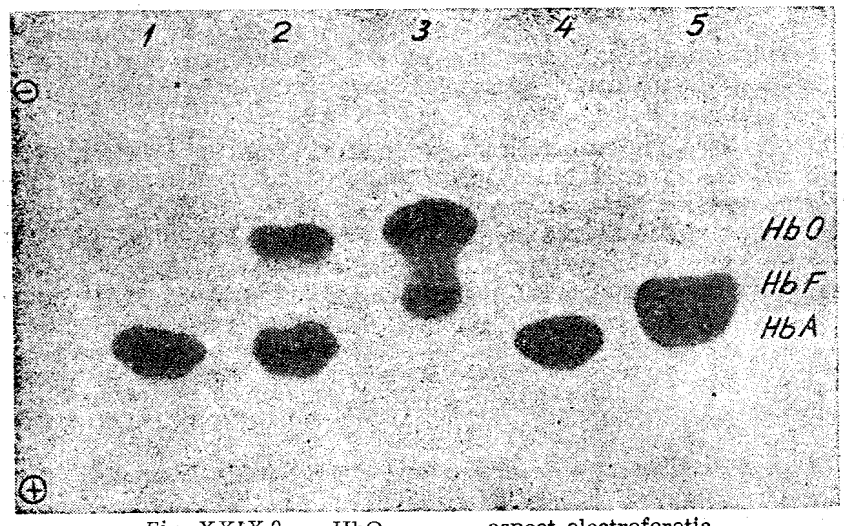


Fig. XXIX.9. — HbO_{Arabia} — aspect electroforetic.
Nr. 1 și 4 = normal; nr. 2 = HbO heterozigot; nr. 3 = asociere HbO+ β-talasemie; nr. 5 = sânge de cordon.

HEMOGLOBINELE INSTABILE

Sunt un grup de Hb anormale în care anomalia structurală duce la instabilitatea moleculei de Hb, cu disocierea și precipitarea intraeritrocitară a subunităților componente și formarea de corpi Heinz.

Deși foarte diferite din punctul de vedere al anomaliei structurale și al poziției acesteia în structura spațială a tetramerului de Hb, aceste Hb anormale au fost incluse într-un grup unic, pe baza mecanismului fiziopatologic comun și al sindromului clinic de anemie hemolitică cu corpi Heinz pe care-l realizează.

Istoric. Prima Hb instabilă la care s-a determinat anomalia structurală a fost Hb Köln (26). După descrierea Hb Köln, în decurs de o decadă, peste 60 de noi Hb instabile au fost identificate și caracterizate. Aceasta s-a datorat pe de o parte perfecționării tehnicilor de investigație, iar pe de altă parte constatării că multe din cazurile încadrate anterior ca: „anemii hemolitice cu corpi Heinz" s-au dovedit a fi cauzate de prezența unei Hb instabile.

În țara noastră, primul caz de anemie hemolitică cu corpi Heinz, cauzat de prezența unei Hb instabile, a fost comunicat în 1971. Întrucât structura Hb anormale în cauză ($\alpha_2\beta_2$ 42 Phe→Leu) era diferită de cea a Hb anormale cunoscute până la acea dată, noua Hb a fost denumită Hb București (5).

Răspândire geografică. Hb instabile sunt Hb anormale cu incidență scăzută pe plan mondial; nu se cunosc zone geografice sau grupuri populaționale în care frecvența acestor Hb anormale să fie ridicată. Deși

numărul variantelor structurale descrise până în prezent este ridicat, majoritatea acestora au fost descrise într-o singură sau în câteva familii.

Fiziopatologie. Tulburarea fundamentală comună tuturor Hb instabile este precipitarea intraeritrocitară a Hb anormale cu formare de corpi Heinz.

Diversele anomalii structurale din Hb instabile sunt localizate în structura spațială a Hb în așa-zise „regiuni critice" care asigură stabilitatea tetramerului de globină. În general, substituirile de aminoacizi din aceste Hb afectează: a) legarea hemului de globină (exemplu: Hb Hammersmith, Hb Torino, Hb Zürich, Hb București); b) legăturile intercatenare de tip α_1 β_1 (exemplu: Hb Philly, Hb Tacoma): c) configurația spațială a lanțurilor globinei (exemplu: Hb Freiburg, Hb Gun Hill, Hb Genova).

Treptele precise ale degradării Hb instabile nu sunt complet elucidate (fig. XXIX.10). Acestea pot fi redate succint astfel: methemoglobi-

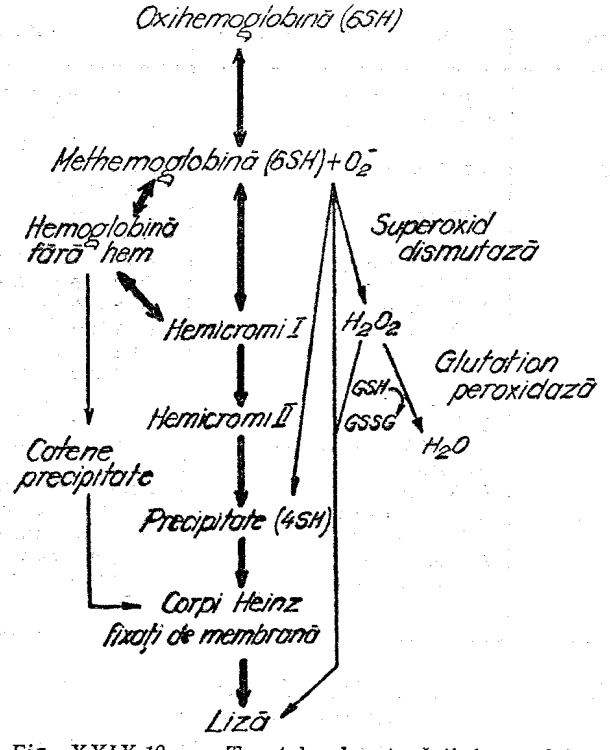


Fig. XXIX.10. — Treptele denaturării hemoglobinei instabile (după Winterbourn și Carell, 1974).

nizare cu pierderea grupărilor hem; disocierea în subunități și formarea compușilor intermediari numiți hemicromi; precipitarea și formarea corpilor Heinz. Un rol important în procesul de oxidare a Hb revine ionului superoxid (O_2^-). Treptele intime ale formării produșilor intermediari de degradare reprezintă astfel puntea de legătură între methemoglobină, ca primă treaptă a oxidării și formarea corpilor Heinz ca ultim produs (19, 25).

Corpii Heinz se fixează pe membrana celulară prin legături disulfurice, dând naștere la alterări de membrană. La nivelul splinei, eritrocitele cu corpi Heinz suferă noi traumatisme: unele sunt reținute în totalitate și distruse, altele sunt redate în circulație după reținerea corpilor Heinz de către macrofagele splenice. Rezultatul final al acestor procese este reprezentat de alterările complexe ale membranei eritrocitare care explică scurtarea duratei de viață a eritrocitelor și hemoliza cronică.

S-a observat că majoritatea Hb instabile au modificarea structurală situată pe lanțurile β (tabelul 29.VI). Este foarte probabil că alterările structurale de acest tip, situate pe lanțurile α, duc la tulburări severe în dezvoltarea embrionului cu oprirea în evoluție.

TABELUL 29.VI

Hemoglobine instabile

Hemoglobina	Anomalia structurală	Tablou clinic
Hb Zürich	β 63 His→Arg	Hemoliza indusă de droguri
Hb Köln	β 98 Val→Met	Anemie hemolitică ușoară cu corpi Heinz
Hb Hammersmith	β 42 Phe→Ser	Anemie hemolitică severă cu corpi Heinz. Cianoză
Hb Freiburg	β 23 Val→O	Anemie hemolitică. Ușoară cianoză
Hb Sogn	β 14 Leu→Arg	Fără răsunet clinic
Hb Genova	β 28 Leu→Pro	Anemie hemolitică ușoară
Hb Sydney	β 67 Val→Ala	Anemie hemolitică ușoară
Hb Torino	β 43 Phe→Val	Anemie hemolitică ușoară
Hb Bibba	α 136 Leu→Pro	Anemie hemolitică severă
Hb Santa Ana	β 88 Leu→Pro	Anemie hemolitică moderată
Hb Sabine	β 91 Leu→Pro	Anemie hemolitică moderată
Hb Wien	β 130 Tyr→Asp	Anemie hemolitică
Hb Gun Hill	β 91—95 sau 92—96 deleție	Anemie hemolitică ușoară
Hb Philly	β 35 Tyr→Phe	Anemie hemolitică ușoară
Hb Shepherds Bush	β 74 Gly→Asp	Anemie hemolitică ușoară
Hb Seattle	β 70 Ala→Asp	Anemie hemolitică
Hb Tacoma	β 30 Arg→Ser	Anemie hemolitică
Hb București (Louisville)	β 42 Phe→Leu	Anemie hemolitică cu corpi Heinz

Tabloul clinic. Tulburările date de Hb instabile îmbracă aspectul de anemie hemolitică cronică asociată cu perioade de exacerbare în care bolnavul devine icteric și elimină urini închise la culoare.

Gravitatea clinică este variabilă și direct corelată cu caracteristicile Hb anormale în cauză. Astfel, Hb Hammersmith produce o anemie hemolitică severă, în timp ce Hb Zürich nu dă decât o anemie hemolitică. ușoară, agravabilă prin administrarea de sulfamide sau de alte medicamente cu acțiune oxidantă.

Semnele clinice cele mai importante sunt splenomegalia, pigmenturia și cianoza (25, 27). Splenomegalia, importantă sau moderată, este semnul clinic cel mai constant, fiind prezentă în 86% din cazuri. Pig-

menturia este prezentă în 64% din cazuri, cu deosebire în perioadele de criză, urina având o culoare brună și conținând dipiroli proveniți din degradarea hemului. Cianoza, cu nuanță albastră-cenușie este manifestă în aproximativ 1/3 din cazuri, fiind caracteristică mai ales pentru hemoglobinele instabile cu tendință mai mare la methemoglobinizare.

Examene de laborator. De regulă, eritrocitele, hemoglobina și hematocritul sunt sub limitele normale și în raport cu severitatea anemiei hemolitice cronice. Modificările morfologice ale eritrocitelor pe frotiul de sânge periferic amintesc de cele întâlnite în talasemie: anizocitoză, poikilocitoză cu frecvente ovalocite, hematii în picătură, hematii cu contur deformat, hipocromie de diverse grade, prezență de hematii în țintă, frecvente hematii cu punctații bazofile (aspect de anemie hemolitică nesferocitară). Reticulocitele sunt de regulă crescute, cel mai frecvent situându-se între 2 și 5%. Leucocitele și trombocitele sunt obișnuit în limite normale, dar la unele cazuri cu splenomegalie importantă pot fi găsite cifre sub valorile normale. Bilirubinemia indirectă și urobilinogenul urinar prezintă creșteri variabile în raport cu gradul de hemoliză. Testul pentru corpi Heinz este foarte util, prezența corpilor Heinz de talie mare și în procent crescut fiind caracteristică pentru aceste hemoglobine anormale. La unele cazuri, corpii Heinz (fig. XXIX.11) pot fi rari sau absenți înainte de splenectomie, dar după îndepărtarea splinei prezența acestora în număr mare este constantă.

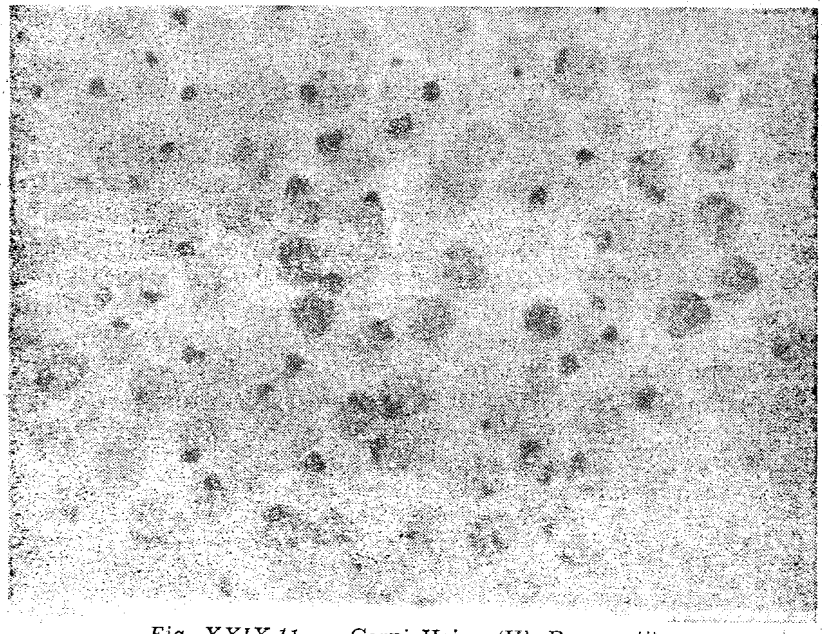


Fig. XXIX.11. — Corpi Heinz (Hb București).

Testul de stabilitate termică (Dacie) și testul cu isopropanol sunt pozitive și patognomonice. Precipitatul care apare în eprubeta cu hemolizat, ținut 2—3 ore la 50°C, pune în evidență instabilitatea structurală a acestor Hb.

Electroforeza Hb efectuată în condiții standard, izolează numai în puține cazuri o fracție anormală corespunzătoare Hb instabile. Cele mai multe dintre Hb instabile au o migrare asemănătoare cu cea a HbA și nu pot fi izolate electroforetic. Aceasta se explică prin faptul că de obicei anomalia structurală constă din înlocuirea unui aminoacid prin altul cu aceeași sarcină electrică, fără a modifica astfel migrarea electroforetică a Hb.

Testul de autohemoliză poate fi pozitiv și adăugarea de glucoză poate da o corectare parțială. Dozarea de methemoglobină arată uneori valori peste normal, oglindind tendința la methemoglobinizare a hemoglobinelor instabile. Examenul de urină pune în evidență, în crizele de deglobulizare, o urină închisă la culoare, cu produși rezultați din degradarea hemului, dipiroli de tip bilifuxină, mezobilifuxină.

Diagnosticul este sugerat de istoric și de examenul clinic și hematologic, care pun în evidență anemia hemolitică nesferocitară, prezentă și la alți membri de familie. Corpii Heinz și testul de stabilitate termică pozitiv duc la presupunerea de anemie hemolitică prin Hb instabilă. Electroforeza Hb ajută la precizarea diagnosticului în cazul în care evidențiază fracția anormală. În multe cazuri, precizarea diagnosticului este laborioasă și dificilă chiar pentru un laborator cu înaltă calificare. Precizarea anomaliei structurale se face prin *fingerprint* și analiza de aminoacizi.

Evoluția este de regulă cea a unei anemii hemolitice cronice întreruptă de perioade de agravare.

Complicații. Splenomegalia importantă se poate complica la unele cazuri cu semne de hipersplenism și sindrom hemoragic prin trombopenie. Colelitiaza este relativ frecventă, mai ales la vârsta adultă.

Tratamentul este simptomatic, comun tuturor hemoglobinopatiilor care se manifestă clinic ca anemii hemolitice. El vizează corectarea anemiei, prevenirea carenței de acid folic, a litiazei biliare și a hemosiderozei. În plus se evită substanțele și drogurile methemoglobinizante, care pot induce hemoliza.

Administrarea de vitamină E ca agent reducător poate fi utilă. Splenectomia este recomandată în cazurile cu hemoliză severă, splenomegalie importantă și semne de hipersplenism.

HEMOGLOBINELE ANORMALE VARIANTE DE HbF

Hemoglobinele anormale variante de HbF sunt hemoglobine anormale cu anomalie structurală pe lanțurile γ.

Cum există patru gene structurale γ (două G_γ și două A_γ), în aceste cazuri una dintre cele patru gene structurale suferă o mutație punctiformă ce are ca rezultat sinteza unor lanțuri cu structură anormală, ce diferă de lanțurile γ normale printr-un singur aminoacid, într-o anumită poziție a lanțului, corespunzătoare codonului de pe gena structurală care a suferit mutația.

Până în anul 1991 se cunoșteau 62 variante structurale ale HbF (30).

Este ușor de înțeles că aceste hemoglobine nu pot fi puse în evidență decât în perioadele de dezvoltare în care HbF prezintă valori procentuale ridicate, și anume: ultimele 5—6 luni de gestație, în sângele de cordon ombilical și în primele 2—3 luni după naștere, după care HbF (inclusiv HbF anormală) scade rapid și este înlocuit de Hb adulte A și A_2.

Cele mai multe cercetări pentru depistarea acestor Hb au fost efectuate pe sânge de cordon ombilical, ușor de obținut la naștere și care conține 60—80% HbF în mod fiziologic.

Electroforeză Hb efectuată pe hemolizatul obținut din sângele de cordon ombilical poate pune în evidență HbF anormală ca o fracție distinctă de HbF normală.

Unele HbF anormale au proprietăți biochimice care pot influența funcția normală a HbF în perioada de dezvoltare fetală, cu toate că procentual ele nu reprezintă decât aproximativ 20—25% din totalul HbF, în situația în care numai una dintre cele patru gene structurale γ a suferit mutația genetică.

Hemoglobinele F-Xinjiang, F-Xin-Jin și HbF-Poole au caracteristici asemănătoare hemoglobinelor instabile; HbF-M-Osaka și HbF-M-Fort Ripley au caracteristici asemănătoare hemoglobinelor M, anomalia structurală a acestor două Hb fiind situată la nivelul legării hemului pe catena γ anormală (G^2_γ 63 His→Tyr și respectiv G_γ 92 His→Tyr), ele găsindu-se sub formă de metHb și producând cianoză, care dispare treptat după naștere, odată cu scăderea procentuală de HbF în general și înlocuirea ei de către Hb adulte. Purtătorii acestor Hb anormale nu au nici o suferință ca adulți, HbA și A_2 fiind normale.

HEMOGLOBINELE ANORMALE VARIANTE HbA_2

Hemoglobinele anormale variante de HbA_2 sunt hemoglobine anormale cu modificare structurală pe lanțurile δ, formula lor generală putând fi scrisă $HbA_2^x = \alpha_2\delta_2^x$, lanțurile α fiind normale, iar lanțurile δ^x purtând anomalia structurală.

Din datele din literatura până în anul 1991 se cunoșteau 20 de variante de HbA_2, majoritatea acestora sub formă de heterozigot, anomalia structurală a lanțului δ fiind situată numai pe una din genele structurale δ. În această situație gena structurală δ normală duce la sinteza de lanțuri δ normale, adică la HbA_2 normală, în timp ce gena δ^x „mutantă" produce sinteză de lanțuri δ^x anormale, care împreună cu lanțurile α (normale) vor forma HbA anormală ($\alpha_2\delta_2^x$) (30).

La electroforeza Hb, aceste variante de HbA_2 pot fi evidențiate și separate de HbA_2 normală (pe placa de electroforeză HbA_2 apare ca 2 fracții minore distincte). Estimarea cantitativă a acestor HbA_2 anormale arată valori procentuale situate în jur de 1% din totalul Hb, HbA_2 normală, situându-se cam în aceeași cantitate (heterozigotism).

În țara noastră, variantele de HbA_2 au fost diagnosticate relativ frecvent, până în prezent numărul de cazuri depășind cifra de 37 de fa-

milii (respectiv 45 de cazuri), majoritatea fiind heterozigoți pentru aceste Hb. Unul din cazuri a fost tipizat structural, dovedindu-se că Hb respectivă este o HbA_2 NYU (δ^{12} Asn→Lys). Este posibil ca și alte cazuri diagnosticate de noi să aparțină aceleiași variante, întrucât migrarea electroforetică este asemănătoare (fig. XXIX.12).

De regulă, dat fiind valoarea procentuală foarte mică (1% din totalul Hb) a acestor HbA_2 anormale, ele nu produc manifestări clinice și

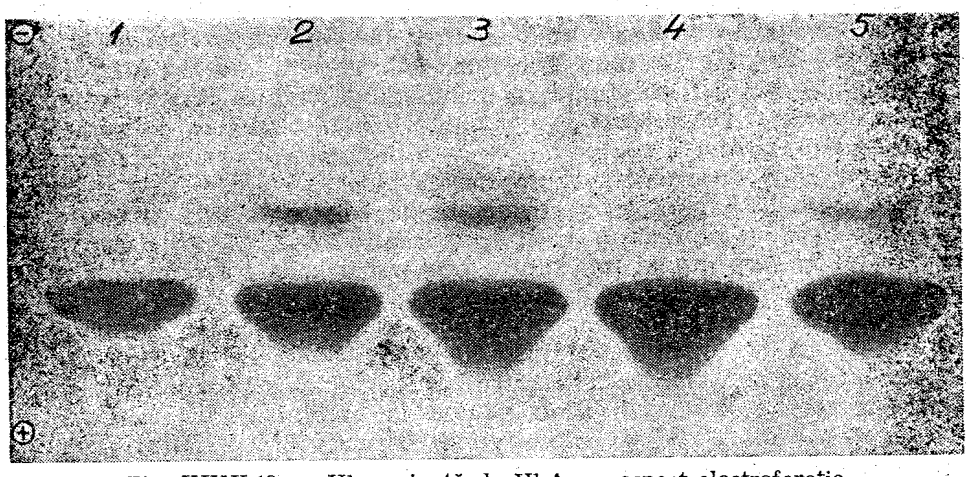


Fig. XXIX.12. — Hb variantă de HbA_2 — aspect electroforetic.
Nr. 1 = normal; nr. 2 și 5 = β-talasemie minoră; nr. 3 = asociere HbNYU (variantă de HbA_2+β-talasemie); nr. 4 = HbNYU heterozigot.

hematologice, majoritatea fiind descoperite întâmplător, în cursul investigațiilor curente efectuate în laboratoarele specializate în domeniul hemoglobinopatiilor.

Într-o familie din cazuistica noastră, HbA_2 anormală era asociată cu β-talasemia minoră: unul dintre părinți era heterozigot pentru HbA_2^x anormală (netipizată structural), iar cel de-al doilea părinte era heterozigot pentru β-talasemie, având valori crescute de HbA_2 (normală); copilul a moștenit ambele anomalii: atât HbA_2^x anormală, cât și HbA_2 normală se situau peste valoarea de 1%, depășind împreună valoarea de 4%, ca și în alte cazuri similare descrise în literatură. Aceasta este o dovadă că β-talasemia heterozigotă cu valori crescute pentru HbA_2 acționează stimulând compensatoriu sinteza lanțurilor δ de pe ambii cromosomi 11 (atât în cis, cât și în trans) ceea ce explică valorile procentuale crescute ale HbA_2^* anormală în raport cu heterozigotul simplu. În literatură se cunoaște un singur caz de homozigotism pentru o variantă de Hb anormală, și anume: HbA_2' sau B_2 (δ^{16} Lys→→Arg) care nu avea decât HbA_2' și deloc HbA_2 normală.

XXX

SINDROAMELE TALASEMICE

C. PREDESCU

Definiţie, delimitare, istoric. Sindroamele talasemice* sunt afecţiuni ereditare, în care scăderea producţiei de Hb normală este cauzată de blocarea parţială sau totală a sintezei unuia din lanţurile polipeptidice ale globinei.

În majoritatea sindroamelor talasemice tulburarea de bază constă dintr-un impas în formarea de eritrocite cu un conţinut normal de Hb adultă şi nu în sinteza unei Hb anormale. Leziunea genetică realizează o scădere cantitativă (parţială sau totală) a sintezei unuia sau unora din lanţurile polipeptidice ale globinei (sinteză dezechilibrată), ceea ce justifică termenul de „Hemoglobinopatii cantitative", atribuit acestui grup de afecţiuni.

Din punct de vedere clinic, sindroamele talasemice se manifestă ca anemii hipocrome microcitare hipersideremice, cu eritropoieză ineficientă, hemoliză şi splenomegalie, care se transmit ereditar ca un caracter autosomal (nelegat de sex).

Istoric. Primele cazuri de talasemie majoră au fost descrise de Cooley şi Lee în anul 1925. În aceeaşi perioadă, o serie de autori au descris o „formă de icter hemolitic cu fragilitate osmotică scăzută", observată în special la adulţi, ce avea să fie cunoscută apoi ca „maladia Rietti, Greppi, Micheli". Rietti a insistat asupra importanţei fragilităţii osmotice scăzute a eritrocitelor, care delimita astfel noua entitate (corespunzătoare talasemiei minore) de sferocitoză ereditară.

În 1932, Whipple şi Bradford au introdus termenul de „talasemie" de la cuvântul grecesc *thalassa* (mare), maladia fiind mai des întâlnită la subiecţii originari din ţările bazinului mediteranean.

Lehndorff şi Caminopetros au formulat ideea transmiterii ereditare a maladiei, dar adevărata relaţie dintre maladia Cooley şi maladia Rietti, Greppi, Micheli a fost stabilită abia după 1940.

* Bibliografia la capitolul Methemoglobinemiile.

Lucrările apărute în acea perioadă au dus la precizarea că heterozigoții fac o formă ușoară de boală, talasemia minoră adesea inaparentă clinic (tară genetică), în timp ce homozigoții fac forma severă a bolii, talasemia majoră.

În 1948, Vecchio a descris Hb alcalinorezistentă din anemia Cooley, iar în 1955, Kunkel și Valenius au descoperit HbA_2 și au semnalat valorile crescute ale acesteia în talasemia minoră.

După anul 1949, odată cu dezvoltarea cunoștințelor despre structura Hb, au apărut lucrări referitoare la tulburarea de bază din talasemie. În 1957, Itano a emis ipoteza defectului în sinteza globinei, iar doi ani mai târziu Ingram și Stretton au formulat ipoteza existenței a două tipuri de talasemie: α-talasemia și β-talasemia, în raport cu lanțul polipeptidic afectat de mutația talasemică. Descrierea primelor cazuri de α-talasemie heterozigotă, de α-talasemie homozigotă, ca și primele cazuri de δ-talasemie au întărit ipoteza lui Ingram și Stretton, dar au constituit totodată dovezi că talasemia nu reprezină o afecțiune unică.

Acest fapt a făcut ca în locul termenului comun de „talasemie" atribuit acestui grup heterogen de afecțiuni, să se folosească ca mai adecvat termenul de „sindroame talasemice" (23).

În tabelul 30.I este prezentată clasificarea sindroamelor talasemice.

TABELUL 30.I

Sindroamele talasemice

I. α-TALASEMIA
   1. α-talasemia 1 sau α°-talasemia
   2. α-talasemia 2 sau α+-talasemia
   3. Sindromul Hb-inei Constant Spring

II. β-TALASEMIA
   1. β°-talasemia
   2. β+-talasemia

III. δβ-TALASEMIA

IV. δ-TALASEMIA

V. γδβ-TALASEMIA

VI. SINDROAME ASEMĂNĂTOARE TALASEMIEI
   1. Sindromul Lepore
   2. Persistența ereditară de HbF
   3. Alte entități genetice

(adaptat după Weatherall și Clegg, 1981)

BETA-TALASEMIA

Sinonime: thalassaemia major și minor, anemia și tara Cooley, anemia mediteraneană, leptocitoza ereditară, anemia cu celule în semn de tras la țintă, microcitemia familială.

Beta-talasemia (β-tal) este sindromul talasemic în care leziunea genetică produce blocarea parțială sau totală a ratei de sinteză a lanțurilor β din molecula de globină. Din acest punct de vedere, β-talasemiile

se împart în β^+-talasemii (cu blocarea parțială a sintezei) și β^0-talasemii (cu blocarea totală a sintezei lanțurilor). Atât β^+-talasemia, cât și β^0-talasemia se caracterizează prin creșterea valorilor HbA_2 în forma de heterozigot. Aproximativ 50% din aceste cazuri au, pe lângă valorile crescute de HbA_2, și valori ușor crescute (2—5%) pentru HbF. β^0-talasemia este o entitate genetică relativ omogenă, care în forma homozigotă se manifestă ca anemie Cooley severă, dependentă de transfuzii. β^+-talasemia este o entitate genetică heterogenă în care se pot distinge cel puțin două subtipuri: subtipul sever mediteranean și subtipul ușor african. Heterozigoții pentru subtipul sever de β^+-talasemie nu se deosebesc clinic și hematologic de heterozigoții pentru β^0-talasemie. În forma homozigotă (β^+/β^+) acest subtip produce o formă severă de anemie Cooley, ca și tipul de β^0-talasemie. Subtipul ușor de β^+-talasemie se găsește obișnuit la populația de culoare de origine africană și realizează, chiar și în forma homozigotă, o formă mai ușoară de boală. Unii autori numesc acest subtip *thalassaemia africana*.

În afară de tipurile amintite, mai există o *β-talasemie cu valori normale de HbA_2 și F*. Aceasta poate fi considerată ca al 3-lea subtip de β^+-talasemie *(silent thalassaemia)*. În acest subtip se pare că blocarea sintezei lanțurilor este foarte ușoară, încât nu produce reacția compensatorie de creștere a sintezei lanțurilor δ și deci a HbA_2.

Talasemia tip $(\delta\beta)^0$ este o entitate genetică caracterizată prin blocarea totală atât a lanțurilor β, cât și δ și prin valori crescute de HbF (2—30%) la heterozigotul adult. Homozigoții pentru $(\delta\beta)^0$ au 100% HbF, cu absența totală a HbA și HbA_2. Leziunea genetică ce stă la baza $(\delta\beta)^0$ talasemiei este o deleție care implică atât genele structurale δ, cât și β. Vechea denumire a acestei entități de β-talasemie tip II sau tip F trebuie părăsită, β-talasemia și $(\delta\beta)^0$-talasemia fiind două entități genetice distincte. Clasificarea sindroamelor β-talasemice este redată în tabelul 30.II.

Răspândire geografică. Beta-talasemia ocupă primul loc pe plan mondial în cadrul hemoglobinopatiilor, atât ca incidență și număr de indivizi afectați, cât și ca gravitate. Boala este întâlnită ocazional la oricare din populațiile de pe glob. Există însă zone cu incidența ridicată, unde talasemia constituie o adevărată problemă medico-socială.

Zona de maximă incidență înconjoară ca o centură globul, pornind din bazinul mediteranean, peste Orientul Mijlociu și India, până în Extremul Orient. Țările europene cu cea mai mare incidență sunt Cipru, Italia și Grecia. În Cipru incidența este de 15—17%; în Italia incidența depășește 15% în regiunea deltei Padului, în partea de sud a țării și în Sardinia, situându-se chiar peste 20% în unele grupe populaționale; în Grecia incidența talasemiei este neuniformă, dar au fost descrise zone cu incidență de 10%. Talasemia este de asemenea frecvent diagnosticată în Iugoslavia (4,7%), Turcia (1,66%) și în partea de sud-est a Bulgariei (2,16%). În celelalte țări mediteraneene europene și nord-africane incidența este ușor mai scăzută și neuniformă, situându-se între 0,5 și 2%. În centrul și nordul Europei talasemia este relativ rar întâlnită la populația autohtonă și relativ frecvent diagnosticată în rândul emigranților originari din țările cu incidența crescută pentru talasemie.

TABELUL 30.II

Sindroamele β-talasemice
(modificat după Weatherall și colab., 1981)

I. TALASEMIA β CU HbA_2 CRESCUTĂ LA HETEROZIGOT (tip I sau tip A_2).
- a) β+-talasemia
  - — tipul sever mediteranean
  - — tipul blând african
- b) β°-talasemia
  - — mai multe subtipuri ce diferă la nivelul molecular
  - — tipul Ferrara

II. TALASEMIA β CU VALORI NORMALE DE HbA_2 LA HETEROZIGOT
- — tipul „silent" — asimptomatic la heterozigot
- — tipul simptomatic la heterozigot

III. ALTE SITUAȚII ASEMĂNĂTOARE β-TALASEMIEI CU VALORI NORMALE DE $Hb\,A_2$
- — genă α supra numerară
- — prezența genei anti-Lepore în cis
- — β-tal + δ-tal
- — β-tal + carență de Fe

IV. TALASEMIA δβ (TIP II SAU TIP F)
- — tipul $G\gamma A\gamma$ $(\delta\beta)^\circ$
- — tipul $G\gamma$ $(\delta\beta)^\circ$

V. SINDROAME TALASEMICE MINORE
- — talasemia $(\gamma\delta\beta)^\circ$
- — talasemia δ

VI. SINDROAME ASEMĂNĂTOARE TALASEMIEI
- — sindromul Lepore
- — persistența ereditară de HbF

β+ și β° reprezintă β— talasemia cu blocare parțială sau totală de sinteză de catene β

Un al doilea focar de mare incidență atât pentru β-talasemie, cât și pentru α-talasemie se găsește în Asia de sud-est, cu deosebire în Thailanda, unde incidența variază între 4,8 și 10% (7, 23, 24).

În țara noastră cercetări populaționale efectuate în sudul țării (14, 16, 23) și ulterior în Moldova (29) au arătat o incidență medie de 0,5%, cu o răspândire ce pare a fi uniformă în diverse grupuri populaționale investigate.

Există date care susțin că talasemia conferă o oarecare rezistență față de malarie, ceea ce ar explica observația că zonele cu maximă incidență pentru talasemie se suprapun peste zonele în care malaria este sau a fost în trecut endemică.

Se estimează că în lume ar exista 150 milioane de purtători ai diverselor tipuri de talasemie, ceea ce reprezintă aproximativ 3% din populația globului.

Etiopatogenie. Beta-talasemia este o boală genetică cauzată de mutații intervenite la nivelul genelor structurale β care controlează sinteza lanțurilor β din structura globinei. În forma sa gravă (anemia Cooley)

ea este caracterizată clinic prin anemie severă, hepatosplenomegalie, întârziere în dezvoltare, expansiunea măduvei osoase și deformări osoase.

Progresele realizate în ultima decadă, în acest domeniu, au dus la elucidarea în cea mai mare parte a leziunilor genetice ce stau la baza diverselor tipuri de β-talasemie întâlnite în practică. Aceste succese s-au

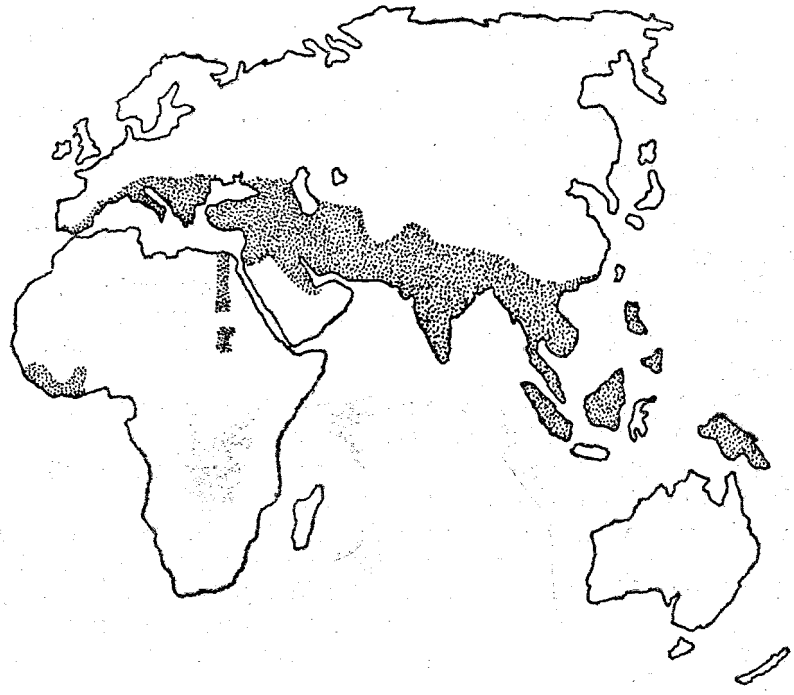


Fig. XXX.1. — Răspândirea talasemiei pe plan mondial.

datorat îndeosebi perfecționării tehnicilor de biologie moleculară (tehnica de restricție a fragmentelor de ADN, tehnica de hibridare de oligonucleotide, tehnica de restricție prin polimerază a catenei de ADN) care au permis o adevărată „disecție" a genelor structurale pentru β-globină și a regiunilor învecinate acestora.

În prezent se cunosc 54 de tipuri de mutații (alele) din care 51 sunt mutații punctiforme și 3 sunt deleții, care explică aproape 99% din totalul cazurilor de β-talasemie din lume. Aceasta arată că β-talasemia este prima dezordine genetică datorată multiplelor tipuri de mutații, care au fost aproape în întregime caracterizate (31).

Din datele deținute până în prezent, rezultă că fiecare grup etnic dintr-o anumită regiune geografică, are propriile sale tipuri de mutații, aceasta explicându-se prin rezistența față de malarie pe care o au bolnavii cu β-talasemie și selecției naturale realizată în cursul dezvoltării și diversificării grupurilor populaționale.

Din cele 54 de tipuri de mutații cunoscute până în prezent, 20 dintre ele sunt cauza a 90% din totalul cazurilor de β-talasemie, celelalte fiind mai puțin răspândite.

Mutațiile din β-talasemie, în raport cu locul unde sunt situate pe ADN, pe toată lungimea regiunii genei structurale β, pot afecta funcția acesteia în diverse moduri:

— regiunea de inițiere a transcripției (promotorului) (extremitatea 5′ a HnARN) cu afectarea transcripției;

— ritmul și nivelul de HnARN transcris;

— maturarea HnARN prin afectarea locului de scindare *(splicing sites)* și eliminarea intronilor;

— joncțiunea normală a exonilor;

— oprirea prematură a transcripției prin realizarea de codoni non-sens sau mutații de tip *frameshift.*

S-a constatat că mutațiile din regiunea promotorului localizate la nivelul structurilor TAT și ACACCC (distal promoter-90 nt) afectează numai parțial transcripția și sunt caracteristice pentru unele cazuri de β-*talasemia intermedia.*

— Mutațiile de tip deleție stau la baza δβ-talasemiei, a *crossing-over*-ului anormal ce produce Hb Lepore și foarte probabil sunt cauza persistenței ereditare de Hb F, deleție în regiunea situată între genele $A\gamma$ și δ (31).

— Codonul „stop" terminal cu realizarea de catene alungite și instabile ca în Hb Constant Spring sau alte Hb asemănătoare.

— Regiunea structurală AATAAA (poly A) sau structurile învecinate, afectând stabilitatea ARNm funcțional.

Din cele expuse mai sus, diversele tipuri de mutații realizează în final fie tipul de β^+-talasemie, fie tipul de β^0-talasemie, cu diversele lor subtipuri, prin blocarea parțială sau totală a sintezei de lanțuri β (31).

Cercetările efectuate în diverse regiuni geografice și grupuri populaționale au precizat tipul sau tipurile de mutație care predomină în anumite regiuni ale lumii.

În zona mediteraneană din 15 tipuri de mutații identificate 6 sunt cele mai frecvente și explică 92% din totalul cazurilor de β-talasemie.

Astfel în Italia și Grecia predomină următoarele tipuri de mutații:

— Intron 1 nucleotid (nt) 110 = β^+-tal
— Codon 39→codon non sens = β^0-tal
— Intron 1 nt 6 = β^+-tal
— Intron 1 nt 1 = β^0-tal
— Intron 2 nt 1 = β^0-tal
— Intron 2 nt 745 = β^+-tal

În Sicilia predomină următoarele tipuri de mutații:

— Intron 1 nt 110 = B^+-tal
— Codon 39→codon non sens = β^0-tal
— Intron 1 nt 6 = β^+-tal

În Sardinia numai 2 tipuri de mutații au fost găsite la 99% din cazurile investigate:

— Codon 39→codon non sens = β^0-tal
— Codon 6→*frameshift.* = β^0-tal

Mutația codonului 39 explică 95% din totalul cazurilor de β-talasemie din Sardinia.

În Turcia predomină mutația de tip *frameshift* la nivelul codonului 8, iar în Spania mutația codonului 39→codon non sens (β^0-tal) (31).

Fiziopatologie. Anemia din β-talasemie și în general din sindroamele talasemice este rezultatul interacțiunii a două mecanisme: eritropoieza ineficientă și scurtarea duratei de viață a eritrocitelor.

Tulburarea majoră din β-talasemie este constituită din blocarea sintezei lanțurilor β și rămânerea în exces a lanțurilor partenere α care precipită ca incluzii intraeritrocitare (corpusculi Fessas).

Intensitatea tulburărilor din β-talasemie depinde de doi factori importanți: severitatea deficitului de lanțuri β și eficiența compensării acesteia prin creșterea sintezei de lanțuri γ și mai puțin δ. Primul factor, deficiența de sinteză a lanțurilor β are o determinare genetică, blocarea sintezei putând fi parțială (β^+) sau totală (β^0) și aceasta se pare că ține de tipul de mutație talasemică. Cel de-al doilea factor, prin care organismul încearcă să compenseze deficiența de sinteză a lanțurilor β este creșterea sintezei de lanțuri γ și formarea de Hb F. Gradul de compensare al sintezei de lanțuri γ este foarte variabil, dar întotdeauna insuficient, sinteza de lanțuri γ reușind să „satureze" numai parțial excesul de lanțuri α și să reducă numărul incluziilor intraeritrocitare.

La normal, raportul $\alpha/\beta+\gamma+\delta$ este egal cu 1. În β-talasemie acest raport este întotdeauna supraunitar: 2/1—3/1 pentru cazurile heterozigote și mult mai mare pentru cazurile homozigote cu blocarea totală a sintezei de lanțuri.

Creșterea sintezei compensatorii a lanțurilor γ nu este uniformă în toate eritrocitele, HbF fiind neuniform distribuită în eritrocite: unele eritrocite conțin mai multă Hb F, altele numai urme sau deloc; această diferență este probabil dată de apartenența la diverse clone celulare.

Studii bazate pe marcări cu izotopi radioactivi și pe centrifugări înalte au dus la izolarea a două populații de eritrocite în β-talasemie: unele de talie mică, cu foarte puțină HbF, cu multe incluzii celulare și mari deteriorări morfologice și cu o durată de viață foarte scurtă; altele de talie mai mare, cu multă HbF, cu puține incluzii celulare, cu mai puține modificări morfologice și cu o durată de viață mai lungă. Este foarte probabil că precursorii eritrocitelor din prima categorie, cu reduse posibilități compensatorii de a forma HbF și cu mari alterări provocate de excesul de lanțuri α sunt distruși cu prioritate intramedular, explicând astfel eritropoieza ineficientă și cantitatea mare de produși rezultați din degradarea hemului.

Alterările provocate de incluziile eritrocitare la nivelul membranei sunt complexe și reflectate în parte de creșterea permeabilității pentru cationi și de pierderea ATP. Aceste alterări de membrană sunt și mai mult accentuate la nivelul circulației splenice, unde incluziile unor eritrocite sunt reținute și eritrocitele astfel „deteriorate" sunt redate în circulație. Acesta se pare că este mecanismul principal care stă la baza scurtării duratei de viață a eritrocitelor și a hemolizei cronice.

Nu există o corelație între valoarea procentuală a Hb F izolată electroforetic și severitatea maladiei. Severitatea maladiei ține în primul rând de excesul de lanțuri α rămase nesaturate, exprimat prin raportul $\alpha/\beta+\gamma+\delta$.

Tulburările de sinteză ale hemului sunt secundare impasului în formarea globinei. Valori crescute de protoporfirină din eritrocitele talasemice pledează pentru existența unui mecanism de reglare prin *feed-back* a sintezei hemului. Nu este exclus ca leziunile mitocondriale produse prin depunerea de Fe în precursorii seriei eritrocitare să afecteze secundar și activitatea ALA-sintetazei și hemsintetazei de la acest nivel.

Observația clinică a arătat că, la același grad de anemie, copiii cu anemie Cooley au semne de anoxie mai accentuată și o evoluție mai defavorabilă decât cei cu siclemie. Acestea ar putea fi explicate de faptul că HbF are o afinitate mai mare pentru O_2 decât HbS și liberează astfel mai puțin O_2 țesuturilor.

Hiperplazia medulară intensă, ca reacție compensatorie nespecifică a anemiei hemolitice severe, ca și hepatosplenomegalia cauzată de sechestrarea și distrugerea masivă a eritrocitelor, explică celelalte simptome clinice și hematologice din anemia Cooley.

Intensitatea tulburărilor sintezei de Hb este mult diminuată în cazul heterozigoților, mutația talasemică acționând numai la nivelul unui singur cromosom. Cel de-al 2-lea cromosom (cromosomul omolog) funcționează normal și suplinește în parte și funcția omologului afectat. Sinteza compensatorie de lanțuri δ și γ explică creșterea valorilor HbA_2 și HbF. Cantitatea de lanțuri β, sintetizate sub controlul cromosomului normal, împreună cu sinteza crescută de lanțuri δ și γ, reduc în mare parte excesul de lanțuri α și asigură formarea unei cantități „convenabile" de Hb pe celulă. Așa se explică forma ușoară de anemie în talasemia minoră și valorile aproape normale de Hb la cazurile asimptomatice. Suprapunerea unor factori nocivi, ca boli intercurente sau punerea organismului în situații de suprasolicitare (sarcină), deteriorează echilibrul instabil al heterozigotului și anemia poate deveni manifestă și mai greu reparabilă (24).

Morfopatologie. Splina este mare, uneori enormă, adesea cu infarcte, perisplenită și aderențe și prezintă microscopic creșterea stromei, aglomerări de celule spumoase PAS-pozitive și zone de hematopoieză extramedulară.

Modificările osoase apar de obicei la vârsta de 3—4 ani, sunt evidente la 8—10 ani și constau în hiperplazia medularei și atrofia corticalei, cu rarefacție osoasă și structură trabeculară a osului. Aceste modificări produc uneori deformări osoase. La nivelul oaselor craniene, tabla externă și cea internă sunt subțiate și între ele diploea este mult extinsă, ceea ce duce adesea la mărirea calotei craniene.

În măduva osoasă intens hiperplaziată, în special pe seama seriei roșii, se pot găsi macrofage în număr crescut, unele încărcate cu hemosiderină, altele, mai rare, cu aspect de celule spumoase sau celule Gaucher. Pigment feric mai poate fi observat și în ficat, pancreas, ganglioni limfatici, mucoasa gastrică și în alte organe.

Tablou clinic. Întrucât din punct de vedere clinic și hematologic diversele tipuri de β-talasemie, ca și $(\delta\beta)^0$-talasemie sunt foarte asemănătoare, ele vor fi prezentate în comun.

Diversele forme de gravitate pe care le poate îmbrăca β-talasemia sub raport clinic țin în primul rând de starea de homo- sau heterozigo-

tism. Obișnuit, starea de homozigotism se manifestă clinic ca o anemie hemolitică severă, dependentă de transfuzii, cu evoluție progresivă și sfârșit letal în prima sau a doua decadă de viață. Este forma clasică de talasemie majoră sau boala Cooley. Există însă și cazuri homozigote cu evoluție mai blândă, nedependente de transfuzii, care pot atinge vârsta de adult. β-talasemia heterozigotă se manifestă clinic sub diverse forme de gravitate, ce merg de la forma de anemie hemolitică severă la forma de tară asimptomatică. În rândul acestora deosebim:

a) forma de anemie hemolitică severă, cu hemoliză cronică, icter, splenomegalie, ce necesită transfuzii în perioade de decompensare;

b) forma clasică de talasemie minoră ce corespunde termenului de *boala Rietti, Greppi, Micheli,* care se manifestă ca anemie hipocromă hipersideremică de gravitate ușoară sau medie;

c) forma asimptomatică clinic și hematologic, adevărata formă de tară, cu valori normale sau apropiate de normal pentru Hb și Ht, ce corespunde noțiunii de *thalassaemia minima* sau *microcitemia,* descrisă de Silvestroni-Bianco. (Electroforeza de Hb la formele a, b și c arată valori crescute de HbA_2, însoțite sau nu și de valori ușor crescute de HbF);

d) a patra formă clinică de β-talasemie heterozigotă include cazurile asimptomatice din punct de vedere clinic, cu valori normale de Hb și Ht, fără modificări, sau cu modificări eritrocitare minime pe frotiu și cu electroforeza Hb normală (valori normale pentru HbA_2 și F); aceste cazuri relativ rare, corespund noțiunii de *silent thalassaemia.*

Diagnosticul acestor cazuri este dificil și el include tehnici de finețe (tehnica cu leucină marcată cu C^{14}), care pot pune în evidență reducerea ritmului de sinteză a lanțurilor beta și dezechilibrul de sinteză a acestora în raport cu lanțurile alfa (raportul alfa/beta este supraunitar).

Termenul de *thalassaemia intermedia* include formele de talasemie homozigotă cu evoluția blândă, formele heterozigote severe, precum și alte entități genetice ce se manifestă clinic asemănător, ca o anemie hemolitică de gravitate medie. Talasemia intermedia nu corespunde deci unei singure entități genetice, ci mai multor tipuri genetice de talasemie ce se pot găsi sub formă homozigotă, heterozigotă sau diverse asocieri de dublu heterozigotism (tabelele 30.III și 30.IV).

TABELUL 30.III

Corelația dintre formele genetice și clinice în β-talasemie

Forma genetică	Tabloul clinic	Nomenclatura uzuală
Forma homozigotă	Anemie Cooley severă	Talasemie majoră
	Anemie Cooley moderată	
	Anemie hemolitică — moderată — ușoară	Talasemie intermediară
Forma heterozigotă	Anemie hipocromă microcitară hipersideremică	Talasemie minoră
	Asimptomatică	Talasemie minimă

Corelația dintre diversele genotipuri din sindroamele β-talasemice și fenotipurile clinice și hematologice

	Genotip	Tablou clinic	Hemoglobine
1	$\delta\beta/\delta\beta$	normal	normal
2	β^{tal+}/N	Talasemie minoră	HbA_2=3,4—7% HbF ușor crescută în 50% din cazuri
3	$\beta^{tal°}/N$	Talasemie minoră	Ca la pct. 2
4	$\beta^{tal+}/\beta^{tal+}$	Anemie Cooley	HbF=60—80%; HbA=20—40% HbA_2=variabil Catene α libere
5	$\beta^{tal°}/\beta^{tal°}$	Anemie Cooley severă	HbF în totalitate HbA=absent; HbA_2=variabil Catene α libere
6	$\beta^{tal°}/\beta^{tal+}$	Anemie Cooley	HbF=90—95%; HbA=5—10% HbA_2=variabil Catene α libere
7	$(\delta\beta)^{tal°}/N$	Talasemie minoră	HbF=5—20% HbA_2=normal
8	$(\delta\beta)^{tal°}/(\delta\beta)^{tal°}$	Anemie Cooley moderată	HbF=100% Absența HbA și HbA_2
9	$\beta^{tal°}/(\delta\beta)^{tal°}$	Anemie Cooley moderată	HbF în totalitate HbA=absent HbA_2=scăzut
10	β_{γ}^{tal+}/N	Nolmal sau Talasemie minoră	HbF=normal HbA_2=normal („silent gene")
11	β_{γ}^{tal+} / β^{tal+} sau $\beta^{tal°}$	Anemie Cooley ușoară	HbF=10—15% HbA_2=variabil

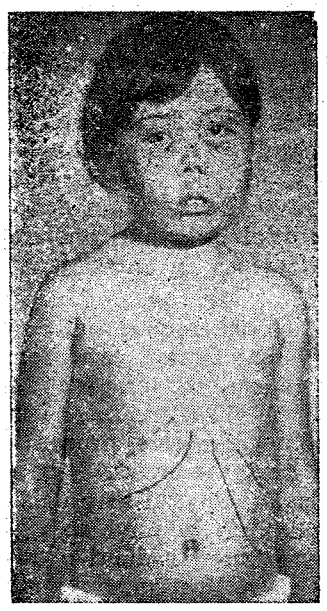
* β^{tal+} și $\beta^{tal°}$ reprezintă tipul de β-talasemie cu blocarea parțială respectiv totală de catene.

** β^{tal+} = β^{tal+} cu valori normale de HbA_2=N=normal.

Debutul în forma de talasemie majoră este precoce, boala putând fi recunoscută încă din a doua jumătate a primului an de viață.

La naștere copilul poate fi aproape normal din punct de vedere hematologic, deoarece sinteza de γ-globină este normală, iar producția de Hb F suficientă. Primele semne sunt paloarea, întârzierea în dezvoltare și creșterea progresivă a abdomenului, datorită hepatosplenomegaliei. Odată cu trecerea timpului, tabloul clinic se completează cu semnele caracteristice ale bolii.

Paloarea accentuată a tegumentelor și mucoaselor însoțită de un grad variabil de icter sau subicter, atrag de la început atenția.



a

b

Fig. XXX.2. — a) Anemie Cooley — copil în vârstă de 8 ani (se remarcă faciesul mongoloid și hepatosplenomegalia); b) anemie Cooley — aspectul radiologic al oaselor craniului („craniu în perie").

Modificările osoase cauzate de hiperplazia medulară intensă de la nivelul oaselor craniului și feței duc la aspectul radiologic de „craniu în perie" (fig. XXX.2 a și b), și la aspectul clinic de „facies mongoloid" (înfundarea și lărgirea bazei nasului, proeminența boselor frontale, hipertrofia maxilarelor superioare cu implantarea vicioasă și tendința la expunere a dentiției superioare). Aspectul radiologic comun este acela de osteoporoză generalizată. La nivelul oaselor lungi, examenul radiologic evidențiază îngustarea marcată a corticalei și lărgirea cavităților medulare. Cu toate aceste modificări fracturile spontane sunt rare, dar fracturi la traumatisme mici se observă relativ frecvent. Splenomegalia este importantă și prezentă la toate cazurile. Creșterea splinei este progresivă cu evoluția bolii, având în multe cazuri aspectul de splină tumorală, ajungând uneori până în micul bazin și provocând distensia evidentă a abdomenului. Există întotdeauna un anumit grad de hepatomegalie care se accentuează după splenectomie. Ulcerele cronice maleolare sunt mai

rar întâlnite decât în siclemie şi apar mai ales la bolnavii care ating vârsta adolescenţei sau de adult. Întârzierea în dezvoltarea somatică este prezentă la majoritatea copiilor şi devine mai evidentă în a doua decadă de viaţă (infantilism), fiind însoţită frecvent de un hipogonadism primar cu întârzierea apariţiei caracterelor sexuale secundare, datorită incapacităţii hipofizei de a produce cantităţile normale de hormoni gonadotropi.

În cursul bolii pot apărea episoade febrile recidivante şi infecţii intercurente. În unele cazuri se pot întâlni limfadenopatii moderate şi tendinţă la sângerări.

β-talasemia heterozigotă sau talasemia minoră este diagnosticată în copilărie sau la adult. Manifestările clinice sunt foarte variabile, mergând de la forma de tară asimptomatică *(thalassaemia minima)*, până la forma de anemie hemolitică moderată, cu icter sau subicter conjunctival şi splenomegalie *(thalassaemia intermedia)*. Bolnavii cu forme minime sau uşoare nu se adresează medicului şi diagnosticul este pus fie întâmplător, cu ocazia unui examen medical periodic, fie în cursul investigaţiilor de screening. Cea mai frecventă formă clinică de talasemie minoră este cea care îmbracă aspectul de anemie hipocromă microcitară, hipersideremică. Majoritatea acestor bolnavi sunt etichetaţi iniţial ca având anemie hipocromă feriprivă sau „anemie refractară" şi au primit în antecedente doze variabile de fier.

Tabloul clinic în talasemia minoră este sărac şi necaracteristic. Paloarea cu discretă nuanţă gălbuie este prezentă la majoritatea cazurilor, putând lipsi la formele minime. Subicterul sau icterul conjunctival se găseşte îndeosebi la formele cu hemoliză cronică şi intensitatea sa variază în raport cu gradul de hemoliză. Splenomegalia este prezentă în aproape 50% din cazuri, splina fiind de obicei moderat crescută, palpabilă la rebord sau depăşind cu puţin rebordul costal. Ficatul este obişnuit în limite normale, iar la un procent însemnat de bolnavi se găseşte un punct colecistic sensibil sau dureros la presiune, trădând o colecistită cronică sau o colelitiază. Modificările osoase lipsesc sau sunt minime şi necaracteristice.

Încadrarea în formele clinice amintite este relativă, mai ales pentru heterozigoţi, întrucât există cazuri de trecere de la o formă clinică la alta, pe de o parte, iar pe de altă parte, un anumit caz poate lua forme clinice diferite, în funcţie de evoluţia bolii şi de factorii agravanţi diverşi, care pot interveni în cursul evoluţiei.

Examene de laborator. În talasemia majoră, anemia este întotdeauna severă şi intens hipocromă, cu valori de Hb obişnuite între 5 şi 7 g/dl şi cu scăderea corespunzătoare a numărului de eritrocite şi a hematocritului. Constantele eritrocitare HEM şi CHEM sunt sub limita normalului, concordante cu încărcarea deficitară cu Hb a eritrocitelor. VEM este însă variabil, în raport cu carenţa de acid folic şi macrocitoza secundară acesteia. Frotiul de sânge periferic este caracteristic sugerând diagnosticul de la primele investigaţii. Hipocromia este foarte accentuată şi însoţită de un înalt grad de anizopoikilocitoză. Numeroase hematii în ţintă, frecvente hematii în picătură şi ovalocite, alături de un număr mare de hematii cu contur deformat şi schizocite de diverse

forme și mărimi, caracterizează frotiul din anemia Cooley. Hematiile în țintă cu marginile îndoite dau aspectul de „pălărie mexicană" și uneori sunt macromegalocite (12—15μ). La cazurile cu Hb foarte scăzută, unele hematii par lipsite de conținut și sugerează aspectul de „umbre eritrocitare". Hematiile cu inele Cabot, corpi Jolly și punctații bazofile sunt frecvent întâlnite. Prezența de eritroblaști este constantă

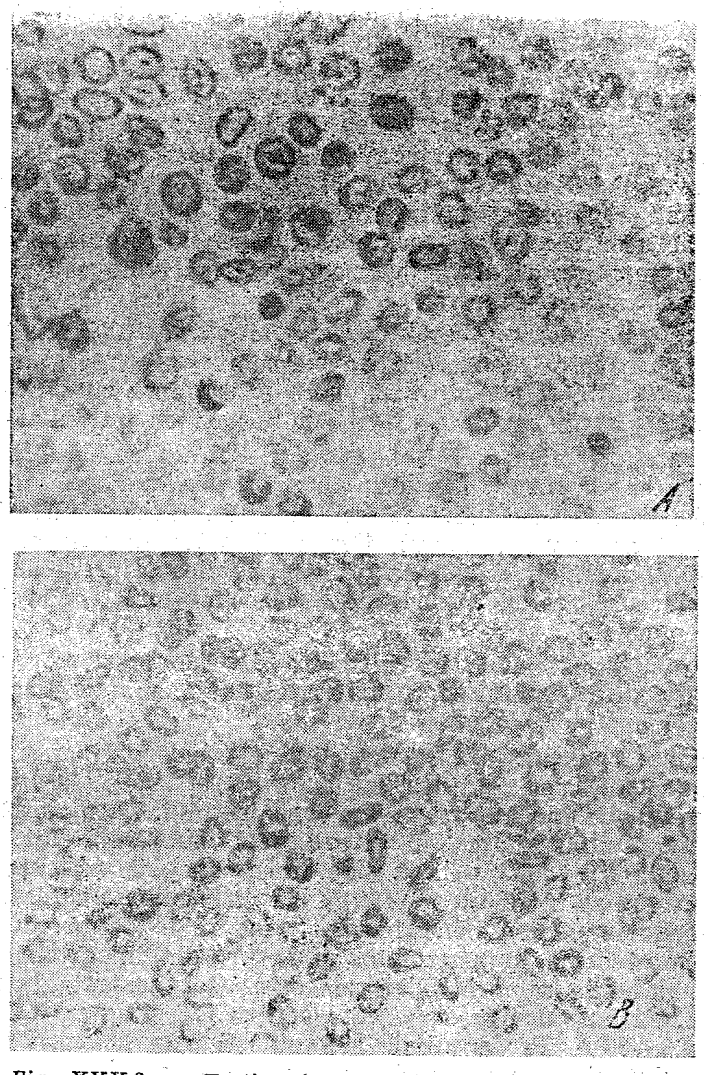


Fig. XXX.3. — Frotiu sânge periferic: a) anemie Cooley; b) talasemie minoră.

(5—20% leucocite), numărul de eritroblaști putând depăși de câteva ori numărul de leucocite la cazurile splenectomizate (300—500% leucocite) Policromatofilia accentuată de pe frotiu oglindește reticulocitoza crescută (5—15%) (fig. XXX.3 a și b).

La talasemia minoră, anemia este moderată (Hb 7—10 g/dl) sau ușoară, formele minime putând avea chiar valori normele de Hb. Gradul de dezordine morfologică eritrocitară este mult diminuat față de talasemia majoră. Aspectul general al frotiului de sânge periferic este de anemie hipocromă microcitară (v. fig. XXVIII.2 b). Totuși, poikilocitoza, prezența de hematii în țintă și de hematii cu punctații bazofile permite diferențierea de tabloul uniform microcitar hipocrom din anemia feriprivă. Policromatofilia ușoară corespunde numărului ușor crescut de reticulocite (2—5%). Eritroblaștii sunt rari (1—2 la câteva sute de leucocite) sau, în cele mai multe cazuri, absenți.

Leucocitoza moderată este constantă în talasemia majoră (10 000—20 000/mm^3 uneori și mai mult) și se însoțește frecvent de deviere la stânga a formulei leucocitare. Uneori au fost observate reacții leucemoide cu celule tinere până la mieloblaști. Cei mai mulți bolnavi au și un număr ușor crescut de trombocite. Formele minore și minime au obișnuit un număr normal de leucocite și trombocite sau situat la limita superioară a normalului.

Bilirubinemia indirectă este crescută (1—3 mg/100 ml), la fel urobilinogenul urinar, ca și excreția de stercobilinogen fecal. În talasemia minoră toate aceste semne de distrugere eritrocitară sunt prezente, dar mult diminuate și în raport cu forma clinică și cu gradul de hemoliză.

Rezistența osmotică a eritrocitelor în soluție salină hipotonă este aproape constant crescută, hemoliza totală situându-se frecvent în jurul concentrației de 0,2 g NaCl/100 ml sau chiar sub această cifră la cazurile cu platicitoză accentuată. Testul, fără a fi patognomonic este util în diagnosticul talasemiei. Există cazuri de anemie feriprivă cu rezistență osmotică crescută, ca și cazuri de talasemie-tară, cu valori foarte aproape de normal.

Determinări enzimatice în eritrocite arată o creștere mare a glucozo-6-fosfatdehidrogenazei și a fosfatazei acide și o scădere a acetilcolinesterazei.

Sideremia, capacitatea totală de legare a siderofilinei (CT), capacitatea latentă (CL), coeficientul de saturare (CS) cu Fe a siderofilinei evidențiază gradul de încărcare cu Fe a organismului. La majoritatea cazurilor de talasemie majoră, CT este situată sub limitele normalului (300—330 μg), cu valori pentru sideremie constant crescute și cu un CS obișnuit situat între 60 și 100%, ca în hemocromatoză. Colorația frotiului medular pentru hemosiderină pune în evidență cantități crescute de hemosiderină în macrofage și un procent important de sideroblaști. În talasemia minoră sideramia este ușor crescută sau normală, în unele cazuri cu valori ușor scăzute pentru CT și cu un CS al siderofilinei de 33—60%. Procentul de sideroblaști este obișnuit peste limitele normalului. Determinarea sideremiei, a CT, a CS, ca și evaluarea Fe medular sunt utile pentru diagnosticul diferențial cu anemia hipocromă feriprivă.

Măduva osoasă în talasemia majoră este intens hiperplazică, cu predominanța evidentă a seriei eritroblastice (GE=1/4—1/8).

Puncția sternală prezintă pericolul unei perforații, datorită consistenței mai moi, spongioase a osului.

La cazurile cu deficit de acid folic, unii eritroblaşti pot avea aspect megaloblastoid sau de paraeritroblaşti şi sunt PAS-pozitivi. În talasemia minoră, frotiul medular arată o celularitate bogată cu predominanţa moderată a seriei eritroblastice. În general, examenul măduvei osoase nu este necesar pentru diagnostic: el este util însă în aprecierea rezervelor de fier, mai ales în cazurile de talasemie minoră cu electroforeza Hb normală sau la limită, ori în cazurile complicate, cu sângerări cronice şi deficit de fier.

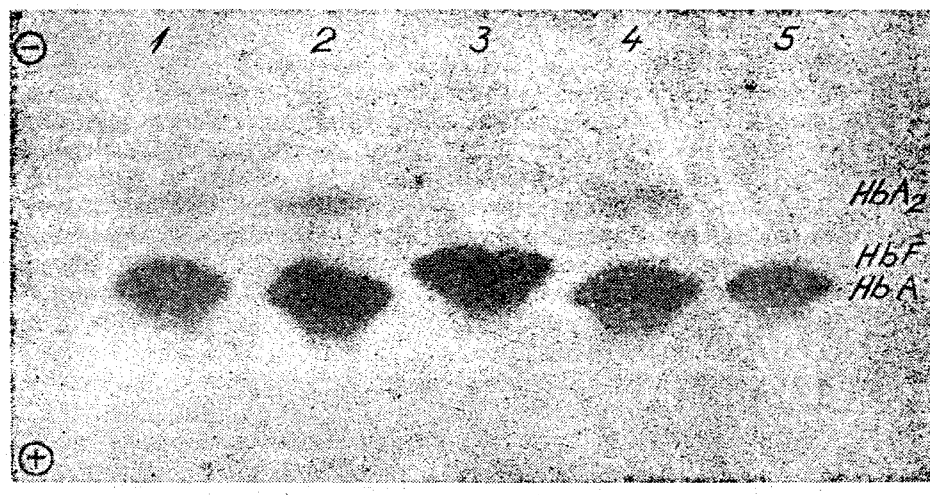


Fig. XXX.4. — Electroforeza de Hb în β-talasemie (nr. 1, 2, 4 — talasemie minoră; nr. 3 — anemie Cooley; nr. 5 — normal).

În eritrocite, activităţile G-6-PD şi a fosfatazei acide sunt mult crescute. Studiile de eritrokinetică au pus în evidenţă scăderea duratei de viaţă a eritrocitelor şi existenţa unei eritropoieze ineficiente.

Electroforeza Hb este tehnica de bază în precizarea diagnosticului de β-talasemie (fig. XXX.4). Talasemia majoră se caracterizează prin valori foarte crescute pentru HbF ($N<2\%$, după vârsta de 1 an), situate obişnuit între 20 şi 90% din tabloul Hb, restul fiind format de HbA şi valori normale sau crescute de HbA_2. Valorile obţinute electroforetic pentru HbF trebuie corelate cu valorile obţinute prin testul chimic de determinare a Hb alcalinorezistente, în scopul eliminării unei Hb anormale cu migrare electroforetică asemănătoare HbF.

β-talasemia heterozigotă se caracterizează prin creşterea valorilor procentuale ale HbA_2 şi/sau F. Cele mai multe cazuri de talasemie heterozigotă (95—98%) sunt caracterizate prin valori crescute pentru HbA_2 situate obişnuit între 4 şi 6% (N 3%). Valorile de 3—4% şi mai ales cele de 3—3,5% trebuie interpretate cu prudenţă şi corelate cu celelalte investigaţii. Aproximativ 50% din cazurile heterozigote de β-talasemie cu HbA_2 crescută au şi valori uşor crescute pentru HbF (2—5%), determinate prin testul de rezistenţă la alcali. Există cazuri de β-talasemie minoră complicate cu deficienţă de fier (naşteri multiple, sângerări cronice etc.), la care electroforeza Hb arată valori nor-

male de HbA_2. După feroterapie, repetarea electroforezei poate evidenția creșterea HbA_2 peste valorile normale. Aceste cazuri nu trebuie confundate cu subtipul rar de βtalasemie, caracterizat prin valori normale de HbA_2 și F *(silent thalassaemia)*.

Cazurile de $(\delta\beta)^0$*-talasemie* heterozigotă caracterizate numai prin creșterea HbF sunt rare (în populația noastră aproximativ 2% din totalul heterozigoților), HbF situându-se între 2 și 30%, cel mai obișnuit între 5 și 15%; HbA_2 este normală sau scăzută, restul Hb fiind reprezentat de HbA. Aceste cazuri trebuie diferențiate de situațiile fiziologice sau patologice în care se pot găsi valori crescute de HbF: sarcina, persistența ereditară de HbF*, anemia Biermer, anemii sideroacrestice, leucemii etc. (23).

Diagnosticul β-talasemiei majore este relativ ușor. Debutul în copilărie și semnele clinice și hematologice de anemie hemolitică severă îndreaptă diagnosticul către o anemie hemolitică ereditară. Aspectul frotiului de sânge periferic exclude celelalte anemii hemolitice eraditare și, în primul rând, sferocitoza ereditară. Electroforeza Hb și determinarea Hb alcalinorezistente confirmă diagnosticul prin punerea în evidență a valorilor foarte mari de HbF.

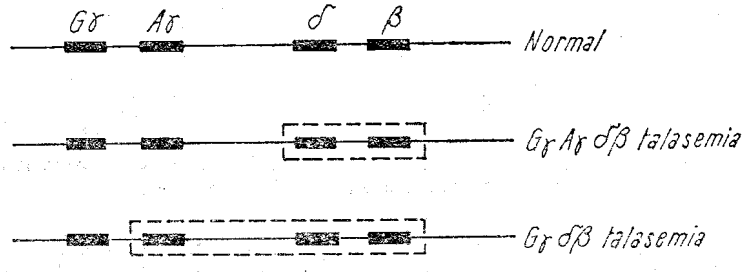


Fig. XXX.5. — Cromosom 11. Deleția în δβ-talasemie (adaptat după Weatherall și colab., 1981).

În β-talasemia minoră, examenele clinic și hematologic sunt mai puțin concludente. Confuzia se face cel mai frecvent cu o anemie hipocromă feriprivă. Totuși, poikilocitoza, hematiile în țintă, hematiile cu punctații bazofile și semnele de hemoliză sugerează talasemia minoră. Sideremia crescută și demonstrarea unei cantități crescute de hemosiderină medulară, întăresc și mai mult această presupunere. Diagnosticul este confirmat de electroforeza Hb și determinarea Hb alcalinorezistente, care pun în evidență valori crescute pentru HbA_2 și/sau F. Investigațiile familiale confirmă transmiterea ereditară: în cazul, talasemiei majore ambii părinți au talasemie minoră, iar în cazul talasemiei minore cel puțin unul din părinți suferă de aceași boală.

Evoluția talasemiei majore netratate este progresivă, cu sfârșit letal, obișnuit în copilărie. Există însă și cazuri care evoluează mai blând și ating vârsta de adult. Și în urmărirea noastră există bolnavi adulți cu

* În talasemie, Hb F este neuniform răspândită în eritrocite în timp ce în P.e. de HbF, aceasta este uniform distribuită în eritrocite.

asemenea evoluție. Merită menționat cazul unei femei care a dus o sarcină la termen în condiții clinice și hematologice mulțumitoare, fără a necesita transfuzii în timpul sarcinii.

Talasemia minoră este o boală în general ușoară, compatibilă cu o durată de viață normală, dar cu o capacitate de muncă redusă.

Complicațiile care pot apărea în cursul evoluției sunt numeroase și variate. Rezistența la infecții a bolnavilor este scăzută și diferite infecții intercurente pot interveni la orice vârstă, agravând cursul bolii. Creșterea progresivă a splinei se complică frecvent cu semne de hipersplenism, cu neutropenie și trombocitopenie. Peste 50% din bolnavi ajung din această cauză la splenectomie. Anomaliile osoase de la nivelul feței și craniului duc frecvent la infecții sinusale și foarte adesea creează probleme ortodontale. Fracturile osoase de la nivelul oaselor lungi și în special la nivelul femurului sunt relativ rar întâlnite.

Una din complicațiile care apare de regulă în cursul evoluției este hemosideroza, cauzată atât de absorbția crescută de fier, cât și de transfuziile repetate. Excesul de fier duce cu timpul la o hemocromatoză secundară. Principalele organe afectate sunt ficatul, glandele endocrine și inima.

În ficat, care este de obicei mărit, concentrația de fier este de 20—30 de ori mai mare ca la normal, fără însă ca ea să altereze notabil funcțiile organului. Cu timpul, fibroza reacțională poate duce la o ciroză hepatică, cu manifestări clinice modeste. Afectarea cardiacă se poate manifesta sub diferite forme: aritmii (extrasistole, tahiaritmii), pericardite, uneori cu repetiție și insuficiență cardiacă congestivă, care este frecventă și apare în medie după circa un an de la începutul manifestărilor cardiace.

În formele cu durată de viață mai lungă pot apărea și alte complicații: diabet, hipoparatiroidism ș.a.

În talasemia minoră complicația cea mai frecventă este litiaza biliară pigmentară, întâlnită la pacienții de vârstă adultă.

Prognosticul bolnavilor fără insuficiență cardiacă a fost ameliorat datorită transfuziilor de sânge corelate cu administrarea de chelatori de fier. El este bun la bolnavii transfuzați regulat și a căror concentrații de feritină serică se situează, cu ajutorul terapiei cu chelatori, sub 2 500 ng/ml. Nu este încă precizat în ce măsură este modificat prognosticul prin aplicarea transplantului de măduvă osoasă alogenică, ca terapeutică alternativă (11 a).

Tratament. Ca în toate hemoglobinopatiile, în sindroamele talasemice nu există un tratament etiologic.

Tratamentul este *simptomatic,* vizând corectarea anemiei și prevenirea complicațiilor, și *profilactic,* urmărind limitarea transmiterii ereditare a anomaliei genetice.

Transfuzia de masă eritrocitară, ca tratament substitutiv este indicată la toate cazurile cu anemie severă (Hb 7—8 g/dl). Conducerea tratamentului transfuzional la bolnavii cu anemie Cooley reprezintă o adevărată problemă de strategie care trebuie să țină seama de o serie de factori: momentul instituirii tratamentului, alegerea preparatului de sânge ce urmează a fi transfuzat, cantitatea și ritmul de administrare a transfuziilor. În prezent, majoritatea autorilor sunt adepții regimului transfuzional intensiv menținut în toată perioada copilăriei, în scopul evitării

tulburărilor de creştere şi dezvoltare produse de anemia severă (10, 23). Transfuziile trebuie instituite de la primele semne de anemie severă, care apar obişnuit în a doua jumătate a primului an de viaţă sau chiar mai precoce, când are loc de fapt şi precizarea diagnosticului. Cantitatea de masă eritrocitară şi ritmul de administrare al transfuziilor variază de la caz la caz. În lotul de copii cu anemie Cooley urmărit de noi, majoritatea bolnavilor necesită transfuzii la interval de 4—6 săptămâni, urmărindu-se menţinerea nivelului de Hb dintre transfuzii la valori situate între 9 şi 12 g/dl. Determinarea Hb şi Ht înainte şi după transfuzie permite evaluarea cantităţii de masă eritrocitară necesară pentru corectarea Ht până la valori de 35—40%. Abuzul de transfuzii trebuie evitat ţinând seama de riscurile izoimunizării, a hepatitei virale şi a hemosiderozei secundare.

Cum durata de supravieţuire a bolnavilor cu anemie Cooley depinde în bună parte de asigurarea unui regim corespunzător de transfuzii, îngrijirea şi controlul lor impune respectarea strictă a tuturor măsurilor menite să prevină izoimunizarea şi accidentele posttransfuzionale produse de aceasta.

Utilizarea strictă a masei eritrocitare evită izoimunizarea în sistemele grupale leucocitare. Acolo unde este posibil, este recomandată tipizarea atât a primitorului cât şi a donatorului, nu numai pentru antigenele clasice OAB şi Rho (D), ci şi pentru alte antigene eritrocitare care pot produce izoimunizarea: C, c, E, Kell şi Fy^a, în scopul administrării unui sânge cât mai compatibil în raport cu aceste antigene. Alegerea flacoanelor de sânge ce urmează a fi transfuzate se face obligatoriu prin proba compatibilităţii directe între serul primitorului şi eritrocitele din flacon în prezenţa papainei, evitându-se astfel reacţiile transfuzionale prin anticorpi imuni apăruţi ca urmare a transfuziilor anterioare.

Tratamentul transfuzional intensiv trebuie corelat cu administrarea intensivă de chelatori de Fe* (deferoxamină-Desferal) în scopul menţinerii unei balanţe de Fe echilibrate şi a temporizării tulburărilor produse de hemosideroza secundară. S-a calculat că un copil de vârstă mare sau un adolescent cu anemie Cooley are un aport anual de Fe de 3—7 g şi că pentru eliminarea unui gram de Fe sunt necesare în medie 50 flacoane Desferal. Administrarea i.v. sau s.c. lentă, care elimină mai mult fier pentru aceeaşi doză de Desferal, este greu de realizat în practică, administrarea i.m. fiind calea cel mai des folosită (2, 9). Recent a fost dezvoltată o tehnică de injectare subcutanată lentă (8—12 ore) printr-o pompă mecanică prin care cu 2 g Desferal se poate chela de 2—3 ori mai mult fier decât prin injecţia i.m.*

Vitamina C în doze de 100—200 mg adăugată la tratament, strict în zilele administrării Desferalului, poate creşte eliminarea urinară de fier. În afara perioadei de tratament cu Desferal, vitamina C este contraindicată, întrucât acidul ascorbic eliberează fierul din depozite.

Transplantul de măduvă alogenică HLA compatibilă, deşi nu este în prezent o terapie la alegere, poate fi considerat ca o alternativă a tratamentului clasic transfuzional şi chelator în anemia Cooley. Progresele

* În prezent este în experimentare un nou chelator de Fe, cu administrare orală: L1, Kelfer sau Deferipnone.

realizate în ultimii ani sunt încurajatoare și numărul de bolnavi cu anemie Cooley care au beneficiat de această terapeutică permite unele concluzii. Thomas și Lucarelli (8) consideră că la bolnavii de vârstă mică (copii în primii ani de viață), netransfuzați sau cu puține transfuzii în antecedente și fără leziuni cardiace sau hepatice produse de supraîncărcarea cu fier, probabilitatea reușitei unui transplant este ridicată, rezultate bune fiind obișnuite în aproape 80% din cazuri. Bolnavii în etate de 8—15 ani, politransfuzați și cu leziuni hepatice sau cardiace produse de încărcarea cu fier, constituie un lot cu probabilitate evident mai mică pentru reușita unui transplant (69%). Toxicitatea procedeului de condiționare (iradiere sau administrare de busulfan, ciclofosfamidă), rejectarea grefei și apariția bolii grefă-contra-gazdă, constituie cauzele care mențin încă un procent ridicat de mortalitate și insuccese ale transplantului de măduvă. Greutatea găsirii în familia respectivă a unui donator de măduvă sănătos, HLA identic, este factorul esențial ce trebuie luat în considerare, mai ales că numărul de copii în astfel de familii este redus.

Administrarea periodică de acid folic este utilă la toți bolnavii cu hemoliză severă, doza variind în funcție de vârstă și de semnele de carență (macrocitoza din sângele periferic sau megaloblastoza medulară); dozele obișnuite sunt 2—5 mg/zi pentru copii și 10—15 mg la adulți, timp de 15—20 de zile pe lună. Vitamina E, ca antioxidant în doze de 100—200 mg/zi poate fi utilă. De asemenea vitamina B_6 și preparate polivitaminice (ce nu conțin fier) pot fi administrate periodic.

Splenectomania este indicată la bolnavii cu fenomene de hipersplenism sau la cei cu splină enormă ce produce tulburări mecanice și disconfort. Micșorarea intervalului dintre transfuzii ca și apariția în evoluție a „transfuziilor ineficiente" pot constitui primele semne de hipersplenism și ele trebuie luate în considerare în stabilirea indicației de splenectomie. Splenectomia poate ameliora evoluția bolii și rări ritmul de transfuzii.

În unele cazuri splenectomia este însă urmată de agravarea hemosiderozei hepatice sau de trombocitoză secundară și complicații tromboembolice. Unii autori recomandă temporizarea splenectomiei până după vârsta de 5 ani, când starea clinică o permite, în scopul diminuării riscului infecțiilor intercurente (septicemii grave cu germeni încapsulați), mai frecvent la copiii splenectomizați sub această vârstă.

Hepatomegalia progresivă este frecvent observată după splenectomie, ficatul putând ajunge la dimensiuni importante, mai ales la cazurile care nu beneficiază de doze suficiente de Desferal.

Cele mai multe cazuri de talasemie minoră nu necesită tratament medicamentos deoarece acești bolnavi se adaptează bine la anemia cronică. La cei cu hemoliză cronică și cu nivel de Hb mai redus (7—9 g/100 ml), administrarea periodică de acid folic este utilă și poate duce la creșterea Hb. Administrarea de preparate colagoge și coleretice poate preveni în oarecare măsură colelitiaza. Colecistectomia este indicată în cazurile cu colelitiază manifestă clinic. Transfuziile de sânge sunt numai rareori necesare în talasemia minoră și numai atunci când anemia devine severă. Feroterapia este contraindicată în toate formele de talasemie. Numai cazurile complicate cu sângerări cronice și numai după o evaluare atentă a rezervelor de fier pot beneficia de feroterapie cu doze reduse și pentru o perioadă limitată.

Tratamentul *profilactic* urmăreşte depistarea tuturor purtătorilor din familiile afectate, îndrumarea profesională a tinerilor către profesii lipsite de factori toxici sau eforturi fizice mari, dispensarizarea balnavilor cu urmărirea lor periodică.

Sfatul genetic se axează pe explicarea naturii bolii şi a riscului de a avea descendenţi afectaţi. Diagnosticul prenatal şi recomandarea avortului terapeutic vizează limitarea răspândirii anomaliei genetice şi naşterea de copii cu forma majoră a bolii în familiile în care ambii soţi sunt afectaţi.

Diagnosticul prenatal. Primele încercări de diagnostic prenatal în β-talasemie, în scopul prevenirii naşterii de cazuri homozigote au fost făcute în 1970, utilizându-se eşantioane de sânge fetal. În 1975 tehnica a fost îmbunătăţită prin utilizarea fetoscopiei.

Dezvoltarea tehnicilor de biologie moleculară care au precizat tipurile de mutaţii din β-talasemie a dus la folosirea acestor tehnici mult mai precise, în diagnosticul prenatal, ele fiind tehnici directe, care pun în evidenţă tipul de mutaţie prin analiza de ADN, obţinut din celulele fetale, fie prin amniocenteză, fie prin probe obţinute din vilozităţile coriale. Perioada optimă de investigaţie este cuprinsă între 9 şi 12 săptămâni de gestaţie.

Diagnosticul prenatal este util în regiunile în care incidenţa talasemiei (sau altor hemoglobinopatii) este ridicată şi probabilitatea formării cuplurilor cu risc crescut este mare (ambii părinţi heterozigoţi pentru talasemie, sau altă hemoglobinopatie).

Diagnosticul prenatal, utilizând aceste tehnici a fost aplicat în ultimii ani în Sardinia, Cipru, Grecia şi Italia şi a dus la o scădere semnificativă a naşterilor de copii homozigoţi. În Italia şi Grecia se apreciază că după aplicarea acestui program, numărul de cazuri noi homozigote a scăzut la 10—20% faţă de perioada anterioară.

Kazazian şi colab. (31) folosesc tehnica de reacţie cu polimerază şi obţin o amplificare a ADN din eşantionul fetal de 10^6—10^7. ADN astfel amplificat este analizat cu cele mai potrivite tehnici, care sunt specifice mutaţiilor ce prevalează în grupul etnic respectiv (tehnica hibridării de oligonucleotide, tehnica cu endonucleaza de restricţie etc.). În prealabil sunt investigaţi şi părinţii pentru determinarea tipului de mutaţie, fapt ce uşurează şi scurtează timpul de determinare a probelor fetale.

Aceste măsuri de diagnostic prenatal se inseră într-un program mai larg de educaţie a populaţiei, de screening pentru diagnosticarea cuplurilor cu risc crescut şi de alte măsuri profilactice utilizate în acelaşi sens, cum este examenul prenupţial al viitorilor parteneri, şi al tinerilor deja diagnosticaţi ca fiind afectaţi de talasemie minoră sau altă hemoglobinopatie.

ALFA-TALASEMIA

Alfa-talasemia este sindromul talasemic în care producerea de Hb normală este scăzută ca urmare a blocării parţiale sau totale a sintezei lanţurilor polipeptidice α din molecula globinei. Aspectul clinic şi hematologic este foarte asemănător β-talasemiei cu care poate fi confundată.

Defectul ereditar în sinteza lanțurilor α produce mai multe entități clinice distincte, cunoscute sub denumirea de α-talasemie sau sindromul α-talasemic. Clasificarea în acest grup de afecțiuni este mai dificilă decât în grupul β-talasemiei. Blocarea sintezei de lanțuri α afectează, în același timp, formarea tuturor celor trei Hb fiziologice (A, A_2 și F), în structura cărora intră lanțurile α. Din această cauză, nu există modificări procentuale ale HbA, A_2 și F, iar electroforeza Hb apare normală la subiectul adult heterozigot cu α-talasemie. În plus, starea (sau stările) de heterozigotism este ușoară din punct de vedere clinic și hematologic, îngreuind atât diagnosticul, cât și diferențierea diverselor tipuri de α-talasemie între ele.

În prezent este admisă existența a cel puțin două tipuri de α-talasemie: α-talasemia 1 (α-tal_1) cu deleția a două gene α în Cis sau forma severă și α-talasemia 2 (α-tal_2) cu deleția a unei singure gene α sau forma blândă (23, 31).

Asocierea acestor două tipuri de mutații realizează o serie de aspecte clinice, hematologice și biochimice, a căror clasificare redată în tabelul 30. V este bazată în special pe aspectul electroforetic al hemolizatului din sângele de cordon ombilical.

Forma homozigotă pentru mutația α-tal_1 este neviabilă și realizează aspectul de *hydrops foetalis,* dat fiind blocarea totală a sintezei lanțurilor α și deci imposibilitatea procedurii Hb normale A, A_2 și F. În această formă copiii născuți sunt edematoși, hidropici, din cauza insuficienței cardiace congestive, consecutive anemiei severe. Homozigoții pentru forma blândă (α-tal_2) și heterozigoții pentru forma severă (α-tal_1) pot prezenta tabloul clinic și hematologic al β-talasemiei minore, dar cu aspect electroforetic normal la adult. Dublu heterozigoții (α-tal_1 + α-tal_2) (deleția a trei gene α) realizează „boala HbH" care se manifestă clinic ca anemie hemolitică de gravitate medie cu hemoliză cronică, subicter conjunctival, splenomegalie și dezordine eritrocitară pe frotiul de sânge periferic, ca în β-talasemie (aspect clinic de thalassaemia intermedia). La electroforeza Hb în sângele de adult cu boala HbH se pune în evidență o fracțiune anormală cu migrare rapidă corespunzătoare HbH (5—30%). Heterozigoții pentru mutația blândă (α-tal_2) sunt asimptomatici clinic și hematologic și cu aspect electroforetic normal la adult.

Examenul electroforetic al Hb la adult, în afara HbH la cazurile dublu heterozigote deja amintite, este nesemnificativ pentru celelalte situații, arătând un aspect normal. Cu excepția „bolii HbH", diagnosticul de α-talasemie la adult este dificil și trebuie să includă investigații complexe clinice, hematologice, electroforetice și familiale, inclusiv electroforeza hemolizatului din sângele de cordon al nou-născutului din familiile afectate.

Mecanismul fiziopatologic din α-talasemie este asemănător mecanismului din β-talasemie. Blocarea sintezei lanțurilor α duce la o sinteză dezechilibrată între cantitatea de lanțuri α (blocate) și lanțurile partenere β și δ. În timpul perioadei fetale și în primele luni după naștere, excesul de lanțuri γ formează tetrameri γ_4=Hb Bart's. În perioada de adult, lanțurile β în exces formează tetrameri β_4=HbH. Ambele aceste hemoglobine sunt nefuncționale pentru transportul de O_2 și au un grad

TABELUL 30.V

Alfa-talasemiile. Corelația dintre diversele genotipuri și fenotipurile clinice și hematologice

	Forma genetică	Genotip	Tablou clinic	Hemoglobine izolate electroforetic
1	normal	αα/αα	normal	normal
2	α tal 1 sau α tal°	— —/αα	Talasemie minoră	Hb Bart's 5—10% la naștere Normal la adult
3	α tal 2 sau α tal+	—α/αα	Asimptomatic clinic	Hb Bart's 0—2% la naștere Normal la adult
4	Hb CS* heterozigot	αα/αCS	Asimptomatic clinic (ca α tal 2)	Hb CS 1—2% HbF și HbA_2= normal (ca adult)
5	α tal 1 homozigot	— —/— —	*Hydrops foetalis*	Hb Bart's 80—90% Restul Hb H și Hb Portland
6	α tal 2 homozigot	— α/— α	Talasemie minoră	Hb Bart's 5—10% la naștere Normal la adult
7	α tal 1 + tal 2	— —/— α	Talasemia intermedia Boala HbH	HbH=2—40%; Hb Bart's=4—5% HbA_2=scăzută. Restul HbA (ca adult)
8	α tal 1+Hb CS	— —/αCS	Talasemia intermedia Boala HbH	Ca la pct. 7 +1—2% Hb CS (ca adult)

* Hb CS=Hb Constant Spring

ridicat de instabilitate. HbH precipită cu ușurință intracelular și formează corpi de incluzie ce pot fi puși în evidență prin tehnica de colorare cu albastru de cresyl (23).

Tulburarea fundamentală din α-talasemie stă la baza celor două mecanisme care explică întreaga simptomatologie clinică și hematologică: eritropoieza ineficientă și hemoliza cronică.

Date recente arată că leziunea genetică din α-talasemie constă în deleția genelor structurale α; există genotipuri în care lipsesc între una și toate patru genele structurale α, ceea ce corespunde diverselor fenotipuri clinice și hematologice (v. tabelul 30. V).

„Boala HbH" ar putea avea la bază două mecanisme genetice: dublu heterozigotism pentru α-tal$_1$+α-tal$_2$ și dublu heterozigotism pentru α-tal$_1$+Hb Constant Spring (CS). Hb CS este o hemoglobină cu lanțuri α alungite (172 aminoacizi) și cu un ritm de sinteză foarte lent. Mutația de tip CS realizează sinteza unor lanțuri anormale, în cantitate foarte redusă (1—2% față de normal), ducând în final la același efect ca mutația talasemică α_2; reducerea sintezei lanțurilor α și exces de lanțuri β partenere.

Incidența maximă pentru α-talasemie se găsește în Extremul Orient, cu precădere în peninsula indochineză (Thailanda). Au fost descrise însă cazuri și în Grecia, Turcia și Italia. În țara noastră n-au fost diagnosticate până acum cazuri de α-talasemie.

Evoluția, complicațiile și tratamentul sunt asemănătoare celor din β-talasemie.

ALTE SINDROAME TALASEMICE

SINDROAMELE TALASEMICE MINIME

• **δ-talasemia** se caracterizează prin blocarea sintezei lanțurilor polipepticide δ. Forma heterozigotă este asimptomatică și se traduce electroforetic prin valori scăzute pentru HbA_2. Forma homozigotă (cazuri rare) poate simula clinic și hematologic talasemia minoră, iar la electroforeza Hb se constată absența totală a HbA_2.

• **γ-talasemia** produce blocarea sintezei lanțurilor γ în perioada fetală. Acest tip de talasemie reprezintă mai mult o noțiune teoretică.

SINDROAME ASEMĂNĂTOARE TALASEMIEI

SINDROMUL LEPORE

Este caracterizat în forma heterozigotă printr-un tablou hematologic asemănător β-talasemiei minore, iar electroforetic prin prezența unei fracții de Hb anormală într-un procent de 5—10%, cu migrare asemănătoare HbS și scăderea procentului de HbA_2.

Din punct de vedere clinic, heterozigoții pentru Hb Lepore îmbracă aspectul β-talasemiei minore sau minime, observație făcută și pe cei peste 100 de bolnavi din cazuistica proprie.

Forma homozigotă a Hb Lepore, cu cazuri rare descrise în literatură, este foarte asemănătoare pe plan clinic anemiei Cooley. Electroforetic la aceste cazuri, Hb Lepore reprezintă 10—20%, restul fiind format de HbF (HbA și HbA_2 lipsesc în totalitate). Hb Lepore este o hemoglobină anormală cu formula α_2 $(\delta\beta)_2$ în care lanțurile α sunt normale, iar lanțurile non-α au o structură asemănătoare lanțurilor δ la capătul N-terminal și lanțurilor β la capătul C-terminal. Ele sunt rezultatul unui *crossing over* inegal între genele structurale δ și β, care sunt situate foarte aproape pe același cromosom. În raport cu nivelul la care este situată fuziunea genelor δ și β, se cunosc trei Hb Lepore: Hb Lepore Washington, Hb Lepore Hollandia, Hb Lepore Baltimore (6, 7, 23).

În țara noastră Hb Lepore este relativ frecvent diagnosticată. Au fost diagnosticate cazuri heterozigote, cazuri de asociere Hb Lepore+β-talasemie (aspectul clinic și hematologic de anemie Cooley) și un caz Hb Lepore+HbS. Până în 1992 erau cunoscute 61 de familii totalizând 146 de cazuri cu această Hb anormală (18).

Hb Miyada și P Congo reprezintă Hb anti-Lepore. În aceste Hb, lanțurile non-α sunt asemănătoare la capătul N-terminal cu lanțurile β și la capătul C-terminal cu lanțurile δ (sunt deci βδ). Ele au același mecanism genetic de formare ca Hb Lepore.

PERSISTENȚA EREDITARĂ DE HbF (PEHbF)

Este o entitate asimptomatică clinic și hematologic, caracterizată prin valori procentuale crescute pentru HbF, uniform distribuită în eritrocite. Heterozigoții au 15—30% HbF, iar unii homozigoți 100% HbF, în afara oricărui semn de boală. S-au descris mai multe tipuri de PEHbF. Cel mai frecvent, anomalia se întâlnește la negri și în Grecia. Mecanismul intim genetic nu este cunoscut; anomalia genetică face imposibilă trecerea de la sinteza de Hb de tip fetal la sinteza de tip adult. Lucrări recente arată că leziunea moleculară ar consta într-o mutație de tip deleție (situată în zona dintre genele Aγ și δ) (11).

XXXI

METHEMOGLOBINEMIILE

C. PREDESCU

Definiţie. Methemoglobinemiile cuprind un grup eterogen de afecţiuni ereditare sau dobândite, caracterizate prin prezenţa în sânge a unei cantităţi crescute de methemoglobină. Methemoglobina (MetHb) reprezintă forma oxidată (Fe^{3+}) a Hb, improprie pentru funcţia esenţială de transport a oxigenului. Clinic, methemoglobinemia se manifestă prin cianoză, semne de anoxie şi, uneori, anemie hemolitică, cu sau fără corpi Heinz.

Istoric. În 1845, François a descris un caz de cianoză fără etiologie pulmonară sau cardiacă, interpretat mult mai târziu ca posibil o methemoglobinemie.

Primul caz de methemoglobinemie ereditară cauzată de o anomalie a Hb a fost descris de Hörlein şi Weber, în 1948, într-o familie de origine germană; la acea dată nu se cunoşteau bolile moleculare şi nu se descoperise încă prima Hb anormală. Tot în 1948, Gibson a arătat că, în cadrul methemoglobinemiilor ereditare, se pot descrie două forme, una datorată unui deficit enzimatic (diaforază sau MetHb reductază) şi alta datorată unei anomalii situată la nivelul globinei din molecula de Hb.

Abia în 1961, Gerald şi Efron descriu primele cazuri de HbM, precum şi anomalia structurală a globinei caracteristică acestora.

Ulterior au fost descrise cinci variante de HbM, caracterizate prin methemoglobinemie şi cianoză, dar care diferă între ele prin anomalia structurală de la nivelul globinei.

Progresele realizate au permis împărţirea methemoglobinemiilor din punct de vedere patogenic în două grupe:

1) *Methemoglobinemii ereditare*, cu două subgrupe: a) prin deficit enzimatic şi b) prin anomalie structurală a unuia din lanţurile polipeptidice ale globinei (HbM).

2) *Methemoglobinemii dobândite*, cauzate de substanţe sau droguri cu acţiune methemoglobinizantă.

Etiopatogenie. Methemoglobinemia dobândită este cea mai frecvent întâlnită. Cauzele multiple şi variate sunt reprezentate de diverse sub-

stanțe chimice methemoglobinizante pătrunse în organism într-o cantitate suficient de mare pentru a depăși capacitatea reductoare a eritrocitului.

TABELUL 31.I

Cauzele methemoglobinemiei

I. EREDITARE
- A. *Anomalie structurală a Hb*
  Prezență HbM
- B. *Deficiența sistemelor reducătoare ale MetHb*
  Deficiența de methemoglobin reductază (NADH-dependentă diaforaza I)

II. CĂȘTIGATE
- A. *Chimice*
  - — Nitriți (de sodiu, amil, etil)
  - — Nitrați (subnitratul de bismut, nitratul de amoniu)
  - — Nitrobenzen, trinitrotoluen
  - — Nitroglicerină
  - — Primachin, clorochin
  - — Fenilhidrazină
  - — Lidocainã, benzocainã
  - — Dapsone
  - — Anilina
  - — Fenacetina
  - — Acetilanilida
  - — Sulfamidele
    - • Sulfanilamida
    - • Sulfapiridina
    - • Sulfatiazolul
  - — Acid paraaminosalicilic
  - — Resorcinol
- B. DIVERSE
  - — Disfuncții intestinale (cianoză enterogenă)
  - — Septicemia cu *Clostridium welchii*

Substanțele toxice cel mai frecvent întâlnite în practică sunt prezentate în tabelul 31.I. Unele din aceste substanțe sunt curent folosite în scop terapeutic, altele pot fi ingerate sau inhalate în mod accidental. Cele mai active sunt derivații de anilină, sulfonamidele, nitriții. Consumarea de apă de fântână contaminată cu nitriți și nitrați (transformați de flora intestinală în nitriți), ori ingestia accidentală de creioane sau cretă cu coloranți de anilină este relativ frecvent întâlnită, mai ales în practica pediatrică. A fost descrisă o cianoză enterogenă cu MetHb și SulfHb, secundară absorbției intestinale crescute de nitriți și compuși cu sulf, rezultate — probabil — printr-o disfuncție intestinală.

Methemoglobinemiile ereditare au la bază un mecanism genetic. Ele au o incidență mică pe plan mondial și nu par a avea un caracter rasial, deși se știe că methemoglobinemia enzimatică este mai frecventă la eschimoșii din Alaska și că în Japonia au fost descrise mai multe familii cu HbM_{Iwate}. La noi în țară au fost diagnosticate până în prezent o familie cu deficit enzimatic și trei familii cu HbM, din care două a fost tipizate ca HbM_{Iwate} (4).

Fiziopatologie. MetHb reprezintă forma oxidată a Hb. Ea diferă de Hb normală prin faptul că fierul hemului se găsește în stare oxidată ferică (Fe^{3+}) în loc de fier bivalent (Fe^{2+}), pierzând astfel proprietatea de a lega reversibil oxigenul și calitatea de pigment respirator.

Zilnic, aproximativ 1% din totalul Hb se transformă în MetHb și cantități sub 2% se găsesc în mod obișnuit la normali.

Menținerea MetHb în limitele fiziologice și reducerea ei în formă de Hb funcțională (Hb—Fe^{2+}) este asigurată de mecanismele enzimatice și neenzimatice de protecție ale eritrocitului.

Mecanismul enzimatic principal este reprezentat de MetHb reductaza dependentă de NaDH (nicotinamid-adenindinucleotid redus) sau diaforaza I. Există și o a doua enzimă, MetHb reductaza dependentă de NADPH (diaforaza II), care însă, în condiții fiziologice, are o activitate redusă.

$$2\ Hb—Fe^{2+} + H_2O_2 \leftrightarrows 2\ Hb—Fe^{3+}—OH\ (MetHb)$$

Glutationul (GSH) și acidul ascorbic intervin în reducerea MetHb pe cale neenzimatică. Valori crescute de MetHb pot apărea în următoarele trei situații: formarea excesivă de MetHb; scăderea funcției de reducere a MetHb în Hb și anomalia structurală a globinei cu transformare ireversibilă a Fe^{2+} în Fe^{3+}. MetHb dă o culoare brună-ciocolatie sângelui și cianoza apare la concentrații de aproximativ 15%, adică 2 g/dl sânge.

Methemoglobinemiile dobândite reprezintă situația în care are loc o formare excesivă de MetHb, în urma acțiunii unor substanțe pătrunse în organism. Mecanismele reducătoare eritrocitare sunt normale, dar sunt depășite de cantitatea mare de MetHb formată. Apariția și intensitatea cianozei sunt legate de cantitatea și momentul pătrunderii în organism a toxicului methemoglobinizant. În primele luni după naștere, cianoza este intensă, chiar la o cantitate relativ scăzută de toxic, datorită faptului că HbF se methemoglobinizează mai ușor decât HbA.

Cianoza din methemoglobinemiile ereditare are unele caracteristici deosebite, care țin de mecanismul de producere al MetHb.

Deficitul genetic de diaforază I, principala reductază a MetHb, stă la baza methemoglobinemiilor enzimatice. Cantitatea de MetHb ce se formează în organism este normală, dar ea se acumulează datorită insuficienței enzimei reducătoare. Cianoza nu apare decât la subiecții homozigoți (boală recesivă), la care nivelul de enzimă este zero sau aproape zero. Cianoza este prezentă încă de la naștere.

Existența unei cantități relativ reduse de MetHb (15—30%), chiar în absența totală a diaforazei I, poate fi explicată prin intervenția compensatoare a celorlalte mecanisme reducătoare: diaforaza II, acidul ascorbic, GSH. Heterozigoții nu prezintă cianoză datorită faptului că au un nivel redus, dar suficient de enzimă, care asigură reducerea MetHb și coloratia normală a tegumentelor și mucoaselor. Părinții unui copil cu methemoglobinemie enzimatică sunt aparent normali, fără cianoză.

Nu există dovezi pentru existența de methemoglobinemii ereditare prin deficit de diaforază II sau glutation. În cazul bolii ereditare cauzată de prezența HbM, formarea de MetHb este explicată de o anomalie structurală a globinei, situată la nivelul legării hemului de globină sau în imediata vecinătate, ceea ce duce la formarea unor legături stabile între lanțul polipeptidic anormal și fierul hemului, cu fixrea ireversibilă a acestuia în forma ferică (Fe^{3+}). Toate cazurile de methemoglobinemie prin HbM reprezintă starea de heterozigot pentru aceste Hb

anormale. Nivelul de MetHb în această boală se situează între 15 şi 30%, explicat de starea de heterozigotism şi de caracterul codominant al anomaliei genetice. În sângele unui asemenea bolnav există astfel un amestec de HbA funcţională (70—85%) şi HbM sub formă de MetHb (15—30%). Forma homozigotă a acestei boli este neviabilă, întrucât întreaga Hb din organism sub forma de MetHb este nefuncţională.

Apariţia cianozei în aceste cazuri depinde de anomalia structurală. În cazul HbM_{Iwate} (fig. XXXI.1) şi HbM_{Boston} cu anomalie structurală pe lanţurile α, cianoza apare la naştere (lanţurile α intră şi în structura HbF) în timp ce pentru celelalte HbM, cu anomalie structurală pe lanţurile β, cianoza apare după primele 2—3 luni de la naştere, când Hb adulte înlocuiesc aproape în întregime HbF.

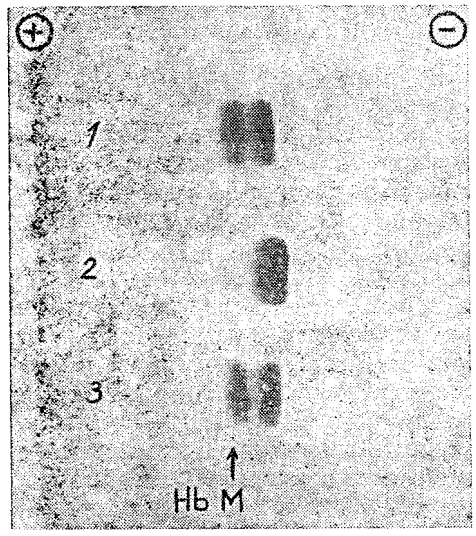


Fig. XXXI.1. — Hb M_{Iwate} aspect electroforetic. (Nr. 1 şi 3 — Hb M_{Iwate} heterozigot: nr. 2 — normal.)

Semnele de anoxie apar obişnuit numai la concentraţii mari de MetHb (peste 30—40%), sau atunci când boala de bază se complică cu alte stări patologice care duc la scăderea Hb sau la o oxigenare scăzută a acesteia la nivelul alveolelor pulmonare. Un bolnav cu methemoglobinemie cu valori pentru Hb de 12 g/100 ml sânge are în realitate numai aproximativ 7—8 g Hb funcţională (60—65%). Anoxia tisulară cronică explică policitemia compensatoare existentă la unele cazuri.

Tablou clinic. Semnul clinic dominant este *cianoza albastră-cenuşie* a tegumentelor şi mucoaselor, deosebită de cianoza roşie-violacee din policitemie. Cianoza apare mai evidentă la nivelul buzelor, unghiilor şi mucoasei bolţii palatului. Intensitatea cianozei este legată de cantitatea de MetHb din sângele circulant.

În methemoglobinemiile dobândite, cianoza este variabilă ca intensitate, de la uşoara tentă cianotică a buzelor şi unghiilor, până la cianoza intensă generalizată. În methemoglobinemiile ereditare, cianoza, de regulă accentuată, este prezentă de la naştere sau apare în primele 3—4 luni după naştere. În cazul bolii dobândite, apariţia cianozei este legată de momentul pătrunderii toxicului în organism, bolnavul declarând că a avut anterior o coloraţie normală a tegumentelor şi mucoaselor.

În afara cianozei, în cazurile în care conentraţia de MetHb depăşeşte 40% din Hb totală, pot apărea semnele provocate de anoxie: oboseală, ameţeli, nelinişte, cefalee, tahicardie, dispnee la eforturi moderate, mioză, somnolenţă.

Examene de laborator. Eritrocitele, hemoglobina şi hematocritul se situează în mod obişnuit în limitele valorilor normale. În unele cazuri de methemoglobinemie ereditară pot fi găsite valori uşor crescute pentru Hb şi Ht, exprimând o uşoară policitemie secundară. Valori uşor scăzute pentru Hb şi Ht, ca şi un număr de reticulocite, la limita superioară a normalului sau peste acesta, pot fi prezente în cazurile rare asociate cu hemoliza cronică. La cazurile de methemoglobinemii toxice cu hemoliză intravasculară, plasma capătă o culoare roşiatică ce poate fi observată la determinarea Ht. Eritrocitele pe frotiul de sânge periferic nu prezintă modificări de mărime, formă şi culoare. Încărcarea cu Hb apare normală.

Un element important şi pentru diagnostic este faptul că valorile presiunilor gazelor sanguine sunt normale.

Dozarea de MetHb prin metoda fotometrică pune în evidenţă valori crescute ale acesteia (peste 2%). Cantitatea de MetHb în methemoglobinemiile toxice şi medicamentoase poate varia în limite foarte largi (5—40%), dar valori situate între 5 şi 10% sunt cel mai frecvent întâlnite.

Examenul spectroscopic al sângelui are o deosebită importanţă în diferenţierea MetHb de alţi pigmenţi derivaţi ai Hb (carboxihemoglobina, sulfhemoglobina etc.) ca şi în precizarea tipului de MetHb. Cea provenită prin oxidarea Hb normale are un spectru de absorbţie caracterizat printr-un maxim de absorbţie la 632 nm; este cazul MetHb din methemoglobinemiile toxice şi medicamentoase, precum şi al MetHb ereditare prin deficit enzimatic. În boala ereditară prin HbM, examenul spectral este „alterat" în sensul prezenţei unui maxim de absorbţie între 600 şi 622 nm, în raport cu tipul de HbM. Acelaşi maxim, între 605 şi 620 nm este dat şi de sulfhemoglobină, dar la aceasta banda de maxim dispare după tratare cu cianură de potasiu, ceea ce permite diferenţierea ei de MetHb, al cărui spectru rămâne nemodificat în aceleaşi condiţii.

Electroforeza Hb pe gel de amidon sau agar, la pH 7,1 este normală în cazul methemoglobinemiilor toxice şi prin deficit enzimatic. În cazul HbM această tehnică permite separarea unei fracţii anormale, cu migrare mai lentă, corespunzătoare acestei Hb.

Determinarea anomaliei structurale şi a tipului de HbM se face prin *fingerprint* şi analiză de aminoacizi.

Se cunosc cinci variante de HbM ce diferă între ele prin anomalia structurală de la nivelul globinei*. În toate cele cinci variante de HbM, anomalia structurală este situată la nivelul sau în vecinătatea legării hemului de globină, ceea ce explică methemoglobinemia şi cianoza, comună celor cinci variante (tabelul 31.II) (30).

Corpii Heinz sunt inconstant prezenţi în methemoglobinemiile toxice şi medicamentoase şi lipsesc de regulă în cele ereditare.

---

* Există şi alte Hb anormale în afara HbM care au tendinţa la methemoglobinizare în anumite condiţii. Ex.: Hb Zürich (β63 His→Arg) se methemoglobinizează în prezenţa unor droguri şi poate da cianoză în cursul administrării acestora.

Urina este obişnuit normală, dar în methemoglobinemiile toxice poate căpăta o culoare închisă datorită eliminării de p-aminofenol sau de derivate de Hb.

Diagnostic. Methemoglobinemia trebuie suspectată în prezenţa unei cianoze fără o cauză bine justificată. Anamneza, examenul clinic, dozarea de MetHb, coloraţia brună a sângelui, spectroscopia şi electroforeza Hb, ca şi răspunsul la tratamentul cu albastru de metilen ajută la stabilirea diagnosticului de methemoglobinemie şi a cauzelor care au produs-o. Diagnosticul diferenţial al methemoglobinemiilor ereditare este prezentat în tabelul 31.III.

Diagnosticul diferenţial se face cu alte boli cianozante: cardiace, pulmonare, policitemia vera (în care cianoza este explicată de creşterea Hb reduse), sau cu prezenţa altor pigmenţi derivaţi ai Hb (carboxiHb, sulfHb). Unele droguri care conţin sulf pot produce în acelaşi timp MetHb şi SulfHb. Există descris un caz de sulfhemoglobinemie congenitală.

TABELUL 31.II

Hemoglobinele M

Hb M	Sinonime	Anomalia structurală	Spectru caracteristic Mx. de absorbţie	Autori
M-Boston	M-Osaka Gothenburg M-Kiskunhalas	α58 His→Tyr	495,600 nm	Gerald şi Efron, 1961 (M Boston)
M-Iwate	M-Kankakee M-Oldenburg M-Sendai	α87 His→Tyr	490,610 nm	Miyaji şi colab., 1963 (M. Iwate)
M-Saskatoon	M-Emory M-Kurume M-Hida M-Radon M-Arhus M-Chicago Leipzig Horlein-Weber Novi Sad M-Erlangen	β63 His→Tyr	490,602 nm	Gerald şi Efron, 1961 (M Saskatoon)
M-Hyde Park	M-Akita	β92 His→Tyr		Heller şi colab., 1966 (M-Hyde Park)
M-Milwaukee	—	β67 His→Tyr	500,622 nm	Gerald şi Efron, 1961 (M. Milwaukee)

(După International Hemoglobin Information Center, Georgia, SUA, 1991)

TABELUL 31.III

Diagnosticul diferențial al methemoglobinemiilor ereditare

Criterii de diagnostic	Methemoglobinemie prin deficit enzimatic	Methemoglobinemie prin HbM
Dozarea de methemoglobină	15—30%	15—30%
Analiza spectrală Mx de absorbție	632 nm	600—622 nm
Administrarea de albastru de metilen	Reduce MetHb la 2—5% Dispare cianoza	Nu reduce MetHb Nu dispare cianoza
Transmitere ereditară	Recesivă. Ambii părinți aparent normali	Codominantă Un părinte cianotic
Electroforeza de Hb	Normală	Fracție anormală de HbM
Fingerprint și analiza de aminoacizi	Normală	Anormale. Precizează anomalia structurală și tipul de HbM

Evoluția și prognosticul depind de cauza care a provocat methemoglobinemia. Methemoglobinemiile dobândite au obișnuit o evoluție favorabilă, boala vindecându-se după îndepărtarea toxicului sau cauzei care a produs-o. Cazurile cu valori foarte mari de MetHb, 50—70% din totalul hemoglobinei, pot fi letale. Methemoglobinemiile ereditare, ca maladii genetice, nu sunt vindecabile și au o evoluție cronică. Subiecții afectați au o durată de supraviețuire aproape de normal.

Complicații. În cazurile de methemoglobinemii dobândite, în care cantitatea de toxic pătrunsă în organism a fost foarte mare, poate apărea o anemie hemolitică și/sau semne de intoxicație generală.

În general, methemoglobinemiile nu dau complicații care să poată fi puse pe seama MetHb. S-a descris un anumit grad de întârziere mintală la unele cazuri ereditare.

Tratament. În methemoglobinemiile dobândite prima măsură este descoperirea și înlăturarea agentului chimic provocator. Fenomenele dispar după câteva zile. În cazuri mai grave sau persistente se poate administra albastru de metilen și acid ascorbic, iar în cazuri extreme se poate ajunge la exsanguinotransfuzie și hemodializă. Albastrul de metilen acționează prin intermediul sistemului NADPH reductază, ce necesită la rândul lui prezența de glucozo-6-fosfatdehidrogenază.

Methemoglobinemia ereditară prin deficit enzimatic răspunde prompt la tratamentul cu albastru de metilen (mecanism enzimatic) și mai puțin la tratamentul cu acid ascorbic (mecanism neenzimatic), dar methemoglobinemia se reface după întreruperea tratamentului (anoma-

lia genetică enzimatică persistă). Soluția de albastru de metilen 1% în ser fiziologic se injectează lent i.v. în doze de 1,5—2 mg/kg corp la copii și de 1 mg/kg corp la adulți, doza putând fi repetată, dacă este necesar. Albastrul de metilen poate fi administrat și oral, în doze de 2—4 mg/kg corp/zi repartizate în 3 prize zilnice, trei zile consecutiv (doza totală 6 mg/kg corp). În doze mari, albastrul de metilen poate provoca anemie hemolitică și semne toxice. Albastrul de metilen acționează enzimatic prin activarea methemoglobin reductazei dependentă de NADPH (diaforaza II). El este lipsit de efect la subiecții cu deficit de glucozo-6-fosfatdehidrogenază la care apare a methemoglobinemie.

Acidul ascorbic se administrează în doze de 200—500 mg oral sau i.v., dar nu este eficace în situațiile de urgență deoarece acționează lent.

Methemoglobinemia ereditară prin HbM nu răspunde la tratamentul cu albastru de metilen și acid ascorbic.

BIBLIOGRAFIE

1. ALTER P. B.: Blood 1984; 64: 2.
2. AKSEY M., BIRDWOOD B. F. G.: Hypertransfusion and iron chelation în thalassaemia, Hans Huber Publ., Berna, 1985.
3. BRATU V., PREDESCU C., BĂLAN ANGELA și colab.: Rev. roum. Med. Int. 1968; 5: 1.
4. BRATU V., PREDESCU C., LEHMAN H.: Rev. roum. Med. Int. 1971; 8: 3.
5. BRATU V., LORKIN A. P., LEHMAN H., PREDESCU C.: Biochim. Biophys. Acta 1971; 251: 1.

5a. GRIFFIN T. C. și colab.: New Engl. J. Med. 1994; 330: 733.

6. LEHMAN H., HUNTSMANN R. C.: Man's haemoglobins, North Holland Publ., Amsterdam, 1968.
7. LEHMAN H., KYNOCH M. A. P.: Human haemoglobin variants and their characteristics, Nord Holland Publ., Amsterdam, 1976.
8. LUCARELL G. și colab.: New Engl. J. Med. 1987; 316: 1050.

8a. MILNER F. P. și colab.: New Engl. J. Med. 1991; 325: 21.

9. MODELL B.: Arch. Dis. Child. 1977; 52: 6.
10. MODELL B.: Med. Bull. 1983; 39: 4.
11. NIENHUIS W. A., ANAGNOV P. N., LEY J. T.: Blood 1984; 63: 4.

11a. OLIVIER F. NANCY și colab.: New Engl. J. Med. 1994; 331: 574.

12. PERUTZ F. M.: Br. Med. Bull. 1976; 32: 3.
13. PREDESCU C., BRATU V., TEITEL P.: Doc. Haemat. 1968; 1: 14.
14. PREDESCU C., BRATU V., BĂLAN ANGELA și colab.: Pediatria 1967; 6: 18.
15. PREDESCU C., BRATU V., LEHMAN H.: First Intern. Symp. Europ., Division Haemat., Milano, 1971.
16. PREDESCU C.: Contribuții la studiul talasemiei în România, Teză doctorat, I.M.F. București, 1970.
17. PREDESCU C., BRATU B., POPA V. și colab.: Rev. roum. Med. Int. 1975; 13: 2.
18. PREDESCU C., ZOLYNEAK C., UNGUREANU D. și colab.: Ann. St. Univ., Iași 1969; 24: 63.
19. RACHMILEWITZ A. E.: Sem. Hematol. 1974; 11: 4.

19a. RODGERS P. G. și colab.: New Engl. J. Med. 1993; 328: 73.

20. ROWLEY T. P., BARNES F., WILLIAMS E.: Hzm. Hered. 1969; 19: 2.
21. SILVESTRONI E., BIANCO I.: Le Emoglobine umane, Edit. Inst. Gregorio-Mendel, Roma, 1963.
22. WEATHERALL J. D.: Clin. Hematol. 1985; 14: 3.
23. WEATHERALL J. D., CLEGG J. B.: The thalassaemia syndromes, Blackwell Sci. Publ., Oxford-Londra, 1981.
24. W.H.O.: The haemoglobinopathies in Europe: Combined report on two WHO meetings: Brussels 1986; Paris 1987; Geneva 1988.
25. WHITE M. J.: Br. Med. Bull. 1976; 32: 3.

26. WILLIAMS J. W., BEUTLER E., ERSLEV A. I. și colab.: Hematology, McGraw-Hill, New York, 1977.
27. WINTROBE M. M. și colab.: Clinical Hematology, Lea Febiger Publ., Philadelphia, 1974.
28. WOOD G. W.: Br. Med. Bull. 1976; 32: 3.
29. ZOLYNEAK C., UNGUREANU D., DONTU L. și colab.: Ann. St. Univ. Iași 1980; 24: 58.
30. Hemoglobin. International Journal for Hemoglobin, Medical College of Georgia, Augusta, S.U.A., 1991.
31. KAZAZIAN H. H., BOEHM D. C.: Blood 1988; 72: 4.
32. THOMSON W. MARGARET: Genetics in Medicine, Saunders Comp., Philadelphia, 1991.

XXXII

ENZIMOPATIILE ERITROCITARE

J. MARCU

Eritroenzimopatiile constituie un grup de afecțiuni hemolitice nesferocitare ereditare, caracterizate prin lipsa parțială, absența sau modificarea structurală a unor enzime intraeritrocitare, cu evoluție acută sau cronică și manifestări clinice de intensitate variabilă.

Enzimele afectate sunt în special cele implicate în metabolizarea glucozei, cu frecvențe variate, de exemplu: aldolaza eritrocitară este foarte rar afectată (doar două cazuri au fost raportate în literatura de specialitate până în anul 1980), în timp ce altele, cum sunt glucozo-6-fosfat dehidrogenaza (G-6-PD) și piruvat kinaza (PK) sunt afectate mult mai frecvent (deficitul de G-6-PD se crede că este manifest la circa 300 milioane de subiecți de pe glob).

O eficiență redusă a oricăreia dintre enzimele care asigură metabolizarea glucozei în eritrocite (indiferent de cauza determinantă), reprezintă un risc considerabil de hemoliză deoarece, dincolo de stadiul de reticulocit, singura modalitate de a asigura cantitatea de energie necesară desfășurării unei activități normale a eritrocitului, ca și potențialul reducător, esențial pentru menținerea integrității structurale a celulei, o constituie degradarea glucozei pe calea metabolică a ciclului Embden-Meyerhoff.

Această entitate nosologică printre anemiile hemolitice congenitale nesferocitare, lipsită de modificări ale Hb și de intervenția unor factori imuni, uneori asociate cu un grad variabil de splenomegalie, dar în care splenectomia nu este totdeauna urmată de rezultate pozitive, a început să se contureze în anii '50, multe din deficitele enzimatice rare au fost însă descrise mult mai recent, pe măsura dezvoltării tehnicilor de investigație mai subtile, introduse în studiul acestor afecțiuni.

Cercetarea deficitelor enzimatice eritrocitare este facilitată de faptul că populația celulară care trebuie evaluată este omogenă, numeroasă și ușor accesibilă în mod repetat.

Pe de altă parte, deficitele enzimatice eritrocitare pot provoca atât tulburări care afectează în mod exclusiv eritrocitele și se traduc prin grade variabile de hemoliză, cât și alte modificări metabolice a căror exprimare clinică are loc la nivelul altor organe sau sisteme. Astfel, tulburările neuromusculare induse de deficitul de fosfo-fructokinază (PFK) sunt mult mai grave decât anemia hemolitică (modestă) care poate însoți această eritroenzimopatie. De asemenea, tulburările psihice și cele vizuale determinate de deficitele de galactozo-fosfat-uridil-transferază și de galactokinază pot să fie însoțite și de modificări ale eritrocitelor fără ca acestea să fie cele mai importante.

Detectarea cauzelor care produc gravele manifestări clinice menționate se poate face cu ușurință prin recoltarea a numai câțiva mililitri de sânge, permițând adoptarea rapidă a măsurilor capabile să prevină instalarea unor leziuni severe ireversibile.

În acest capitol vor fi prezentate principalele defecte enzimatice eritrocitare care se pot însoți de un grad mai mult sau mai puțin marcat de hemoliză, precum și de alte manifestări clinice sau de laborator suficient de semnificative.

DEFICITUL ERITROCITAR DE GLUCOZO-6-FOSFAT DEHIDROGENAZĂ

Deficitul eritrocitar de G-6-PD este o afecțiune transmisă ereditar, caracterizată prin diminuarea în grad variabil a activității G-6-PD, enzimă care catalizează transformarea G-6-P în 6-fosfo-gluconat (6-PG), prima treaptă a ciclului pentozelor. Acest circuit metabolic asigură eritrocitelor un potențial reducător sub forma nicotin-adenin-dinucleotid-fosfatului (NADP), potențial care protejează structurile funcționale ale eritrocitului de procesele de oxidare.

Fenomenele hemolitice pe care le poate determina acest deficit enzimatic eritrocitar de cele mai multe ori sunt declanșate de contactul eritrocitelor cu unele medicamente sau substanțe chimice cu potențial oxidant, dar pot apărea și ca urmare a unor infecții virale sau bacteriene sau a modificărilor pH-ului sanguin.

În general, deficitul eritrocitar de G-6-PD este scos în evidență de orice condiție care solicită mecanismele reducătoare ale hematiei.

Istoric. Primele relatări privind efectele nocive ale unor medicamente asupra eritrocitelor datează din anul 1929, an în care s-a raportat primul caz de „sensibilitate" la primachină (antimalaric de sinteză), sensibilitate manifestată prin hemoliză autolimitantă.

În 1950, odată cu introducerea unor tehnici noi (atât enzimatice, cât și cu ^{51}Cr) de evaluare a duratei de viață a eritrocitelor, s-a stabilit că hemoliza provocată de primachină (ca și de alte antimalarice) era consecința lipsei G-6-PD din eritrocitele persoanelor afectate. Hemoliza era declanșată de primul contact cu medicamentul, după care noile eritrocite introduse în circulație se dovedeau a fi rezistente la efectele preparatului. Un nou contact cu același medicament determină o nouă criză de hemoliză. Studii ulterioare efectuate cu ^{59}Fe au demonstrat că eritrocitele vârstnice sunt sensibile la contactul cu substanța, în timp ce eritrocitele tinere pot rezista la hemoliză.

Numeroase studii efectuate în ultimii 20 de ani asupra eritrocitelor deficitare în G-6-PD (2, 5, 6, 7, 16, 17, 18, 24) au arătat că această tulburare este de fapt un conglomerat heterogen de anomalii enzimatice, variațiile în gradul de severitate al manifestărilor clinice, și în special al hemolizei, fiind dependente de tipul mutațiilor survenite în gena structurală care codifică sinteza G-6-PD.

Deficitul de G-6-PD nu este prezent numai în eritrocite; el a fost găsit și în leucocite, trombocite, ficat, piele, cristalin, cu variante condiționate rasial.

Răspândire geografică. Deficitul eritrocitar de G-6-PD este cea mai frecventă enzimopatie cunoscută. Această tulburare este întâlnită în special în regiunile calde ale globului, în asociere (geografică) cu malaria, în special în bazinul mediateranean, în Africa de Vest și în Asia de Sud-Est, regiuni în care se știe că există o frecvență ridicată a unei hemoglobinopatii severe, siclemia (fig. XXXII.1).

Unele ipoteze recente sugerează că atât siclemia cât și deficitul eritrocitar de G-6-PD ar fi rezultatul unei „selecții prin malarie", asigurând purtătorilor acestor defecte un avantaj relativ împotriva parazitării cu plasmodii, în special cu varianta *falciparum* deoarece, așa cum au demonstrat o serie de studii experimentale, parazitarea, ca și dezvoltarea plasmodiilor în eritrocite, sunt mai dificile în condiții de deficit de G-6-PD sau de siclemie.

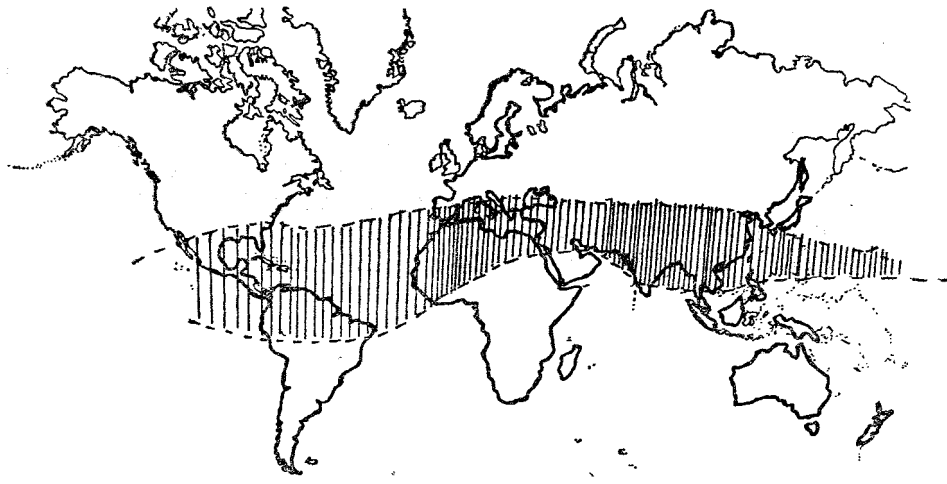


Fig. XXXII.1. — Aria de răspândire geografică a deficitului de G-6-PD.

În țara noastră, deficitul de G-6-PD, semnalat prima oară în 1959, nu are o distribuție specială, această eritroenzimopatie fiind întâlnită cu o frecvență redusă în toate regiunile.

Studiile efectuate în țara noastră (în zona București, Moldova, Dobrogea, Transilvania) au arătat că deficitul de G-6-PD reprezintă circa 10% din totalul anemiilor de tip hemolitic investigate, frecvența sa în populația generală fiind de circa 0,01%. Extrapolarea datelor obținute în cadrul cercetării unei populații de donatori sănătoși de sânge permite să

se estimeze cifra persoanelor cu deficit eritrocitar de G-6-PD din țara noastră la 1 500—2 500.

Genetică. Deficitul eritrocitelor de G-6-PD poate fi determinat de una din numeroasele anomalii care pot afecta gena ce dirijează sinteza acestei enzime prin codificarea secvenței de aminoacizi încorporați în molecula respectivă. Mutațiile care survin la nivelul genei pot duce la una din următoarele anomalii: sinteza unei cantități reduse din enzima normală; sinteza de molecule enzimatice cu afinitate redusă pentru substratul corespunzător; sinteza de molecule enzimatice cu stabilitate redusă și sinteza de molecule cu alterări asociate.

Gena care specifică sinteza de G-6-PD se găsește pe cromosomul X, în vecinătatea unor *gene care pot determina uneori alte anomalii* (albinismul irisului, ihtioza palmoplantară), anomalii care pot fi (rareori) asociate cu deficitul eritrocitar de G-6-PD (fig. XXXII.2). Transmiterea deficitului se face deci legată de sex, de la mamă la fătul mascul sau femel, dar manifestarea deficitului nu este identică la bărbat și la femeie datorită faptului că unul din cei doi cromosomi X ai femeii este inactiv genetic. Acest lucru a fost demonstrat de prezența unor cantități identice de proteine specifice de genele de pe cromosomul X, atât la femeie cât și la bărbat, deși femeia are doi cromosomi X.

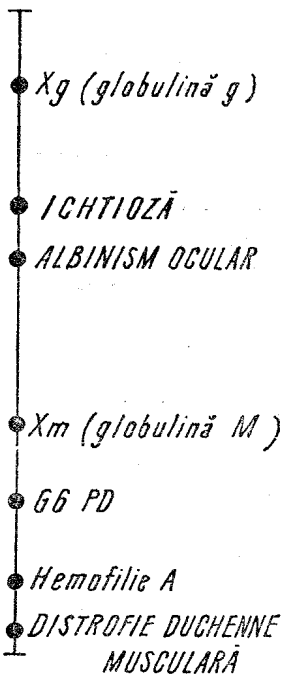


Fig. XXXII.2. — Localizări genice pe cromosomul X.

Femeile heterozigote pentru G-6-PD au o dublă populație eritrocitară, una normală și alta deficitară.

Bărbații care au moștenit de la mamă un cromosom X purtător al unei gene deficitare vor prezenta un deficit de G-6-PD exprimat complet, cel mai adesea fiind vorba de un deficit relativ sever, spre deosebire de femeile purtătoare ale deficitului, la care proporția dintre eritrocitele normale și cele patologice poate varia considerabil, ca și simptomatologia legată de această tulburare.

Corolarul acestei situații este că detectarea tuturor cazurilor de heterozigotism pentru acest tip de deficit enzimatic este deosebit de dificilă.

Faptul că modul de transmitere al acestei genopatii — prin intermediul cromosomului X — a fost precis identificat, a permis să se efectueze importante studii de genetică umană, folosind gena defectă drept marker genetic. Această caracteristică a deficitului a deschis de asemenea noi perspective în domeniul antropologiei.

Până în prezent s-au izolat peste 300 de izoenzime ale G-6-PD eritrocitară, într-un fel situația în acest domeniu fiind similară cu cea care a survenit în privința hemoglobinelor; numai puține dintre acestea sunt însă mai frecvent întâlnite. Enzima normală este denumită G-6-PD^{B}.

Fiecare izoenzimă este definită prin aplicarea unui set de criterii care includ: a) activitatea eritrocitară (exprimată în unități de activitate enzimatică); b) constanta Michaelis (cea mai mică concentrație de substrat la care enzima poate funcționa cu o eficiență normală); c) mobilitatea electroforetică (în medii diverse: bloc de amidon, acetat de celuloză); d) pH-ul optim la care enzima are maximum de activitate; e) stabilitatea termică; f) capacitatea de a utiliza alte substraturi în afara celor specifice; g) gradul de afinitate pentru substratul specific.

La persoanele de rasă caucaziană care au deficit de G-6-PD eritrocitar se găsește cel mai adesea izoenzima de tip M sau GD^{Med} (mediteraneană), activitatea acestei variante fiind foarte redusă. Izoenzima de tip A (Gd^{A+}), care se găsește la persoanele de rasă neagră, are o activitate de 5—15% din activitatea normală.

Există și unele izoenzime care au *in vitro* activități mai mari decât cele normale.

Etiologie și patogenie. Fenomenele hemolitice pe care le poate determina deficitul de G-6-PD sunt declanșate de contactul cu diverse medicamente sau alți compuși chimici (tabelul 32.I), dar pot apărea și ca

TABELUL 32.I

Medicamente și alte substanțe chimice cu rol declanșator în anemia hemolitică prin deficit de G-6-PD

Antimalarice	*Sulfone*
Clorochin	Diaminodifenilsulfon (Dapsone)
Mepacrin (Atebrin)	Sulfoxone
Primachin	
Antipiretice și analgezice	*Diverse*
Fenacetin	Vitamina K și analoage
Acid acetilsalicilic (în concentrații mari)	Dimercaptopropanol (BAL)
	Probenecid
	Chinidină
Sulfamide	Albastru de metilen
Sulfanilamidă	Naftalină și derivate
Azulfidin	Trinitrotoluol
Sulfisoxazol	Acid ascorbic (în concentrații mari)
Sulfafurazol	Neosalvarsan
Alte medicamente antibacteriene	
Cloramfenicol	
Acid nalidixic	
Acid paraaminosalicilic (PAS)	
Nitrofurantoin	
Furazolidon	
Nitrofurazon	

urmare a unor infecții virale sau bacteriene ori a modificărilor pH-ului sanguin în cursul unor tulburări metabolice (diabetice sau de altă natură), precum și după consumul unor alimente (boabe de *Vicia fava*). Mecanismele care determină hemoliza în cadrul deficitului eritrocitelor de G-6-PD sunt, printre altele, legate de apariția în eritrocite a corpilor Heinz (cap. XXXI). Incapacitatea șuntului pentozelor de a genera în absența G-6-PD o cantitate suficientă de glutation redus (GSH) facilitează

oxidarea proteinelor, formarea de glutation oxidat (GSSG) și de methemoglobină (MetHb). Procese de degradare oxidativă pot surveni și la nivelul proteinelor structurale și al enzimelor conținute în membrana eritrocitelor, ducând în cele din urmă la liza celulară.

Agregatele de Hb denaturată care se fixează pe suprafața internă a membranelor eritrocitare determină rigidizarea și deformarea acestora, ceea ce duce la eliminarea lor din circulație la nivelul splinei.

În cazul infecțiilor virale sau bacteriene se pare că unul din factorii implicați ar fi formarea unei cantități crescute de peroxid de hidrogen de către leucocitele care fagocitează agenții infecțioși.

În ceea ce privește hemoliza asociată consumului de *Vicia fava,* ea este probabil determinată, printre altele, și de factori imunologici.

Tabloul clinic. Simptomatologia clinică a deficitului eritrocitar de G-6-PD se rezumă la manifestări caracteristice pentru anemia hemolitică de tip intrinsec. Trebuie subliniat faptul că fenomenele de hemoliză se manifestă doar la acele persoane la care activitatea enzimatică este mai mică de 20% din valoarea normală.

Cel mai adesea hemoliza are un caracter acut, accidental, urmând fie contactului cu unele medicamente, substanțe chimice, fie ingestiei de anumite alimente (boabe de *Vicia fava),* fie infecției cu unele virusuri (virusuri gripale, virusul hepatitei epidemice de tip B).

În multe cazuri însă hemoliza este mai puțin dramatică, hemoglobina scăzând doar cu 2—4 g/dl, și episoadele pot trece neobservate.

În perioada perinatală, deficitul se poate manifesta cu o intensitate deosebită în condiții similare cu cele determinate de incompatibilitatea feto-maternă din punctul de vedere al grupului sanguin, sindrom cu care poate adesea să fie confundat. Dacă nu se identifică rapid cauza hemolizei și dacă aceasta este suficient de intensă, pot apărea fenomene de tipul icterului nuclear.

Unele variante ale enzimei pot determina o hemoliză cronică, asemănătoare cu cea observată în anemiile hemolitice sferocitare. În formele de gravitate moderată sau medie fenomenele hemolitice au un caracter autolimitant, asociat cu apariția unui număr crescut de reticulocite în circulația bolnavului.

Manifestările clinice apar la 1—3 zile după contactul cu factorul cauzal și constau în icter, dureri abdominale, în membre și în spate, simptome de anemie acută (amețeli, palpitații, dispnee), oboseală, febră, uneori tendință la colaps, diaree. Datorită hemolizei, hemoglobina colorează plasma în roz sau brun, iar urina devine roșie sau brună. În cazul în care hemoliza este importantă se pot asocia fenomene de insuficiență renală.

După circa o săptămână apare o remisiune chiar dacă contactul cu agentul declanșator se mai menține.

Examene de laborator în cursul hemolizei. Anemia este de obicei normocromă; în hemolizele mai acute și mai intense se notează scăderea hemoglobinei și apariția de corpi Heinz intraeritrocitari. Pe frotiu se constată frecvent o macrocitoză cu deviere la dreapta a curbei Price-Jones, care poate avea două vârfuri. Uneori se observă anizo- și poikilocitoză, policromatofilie și mai rar eliptocite și corpi Jolly. Reticulocitoza este evasiconstantă și apare după 4—5 zile de la episodul hemolitic. Au fost

semnalate și leucotrombopenii (pancitopenie), mai ales în cursul unor procese infecțioase. Măduva prezintă o hiperplazie a seriei roșii cu predominanță de normoblaști. Reticulocitele conțin cantități mult mai mari de G-6-PD decât eritrocitele adulte.

Testul de autohemoliză (deficitul de piruvat kinază) permite unele diferențieri în cadrul enzimopatiilor, precum și deosebirea lor de anemiile hemolitice sferocitare.

Determinarea enzimei se poate face prin măsurarea producției formei reduse a nicotinamid-adenin-dinucleotid fosfatului (NADH), care însă pentru a da un rezultat corect necesită prezența de 20—30% eritrocite cu deficit enzimatic. Un alt test cu sensibilitate ceva mai mare este testul cu cianură-ascorbat care măsoară capacitatea eritrocitelor de a preveni oxidarea indusă de ascorbat a hemoglobinei. Acest test poate decela și alte anomalii ale șuntului hexozomonofosfat și ale metabolismului glutationului. Pentru screening se folosesc mai mult testele bazate pe decolorarea mediată prin colorant a nicotinamid-adenin-dinucleotid fosfatului (NAD^+) sau pe reducerea methemoglobinei în prezența albastrului de metilen, care sunt însă mai puțin sensibile, ele necesitând prezența de 30—40% eritrocite cu deficit enzimatic. Rezistențele osmotică și mecanică ale eritrocitelor sunt normale (13 a).

Bilirubina liberă (indirectă) este crescută în ser. Lactat dehidrogenaza este crescută corespunzător cu hemoliza. Testul Coombs este negativ. În afara episoadelor acute determinate de contactul cu unul din factorii menționați, purtătorii acestui deficit nu manifestă nici un fel de anomalie morfologică sau funcțională a eritrocitelor.

Hemoliza cu caracter cronic, de mică intensitate, care însoțește unele din variantele anormale ale enzimei, determină instalarea unei splenomegalii de dimensiuni variabile. Fenomenele hemolitice apar din copilărie, evoluția cronică poate conduce adesea la un diagnostic eronat de sferocitoză ereditară, fiind întreruptă de perioade de exacerbare determinate de infecții sau de contactul cu unele substanțe chimice. În astfel de cazuri, lipsa unor modificări morfologice caracteristice ale eritrocitelor, ca și prezența unor teste pozitive pentru deficitul de G-6-PD permit să se stabilească diagnosticul exact.

Un tablou clinic de o gravitate mai mare se observă în cazul în care purtătorii unei anumite variante enzimatice (varianta M — Mediteraneană) ingerează boabe de *Vicia fava*, un aliment folosit mult în Orientul Apropiat și Mijlociu. Hemoliza este atribuită unor derivați oxidanți pirimidinici — divicină și izouramil — prezenți în concentrații mari în boabele de *Vicia fava*. La acești bolnavi hemoliza este intensă și se poate însoți, în special la copii, de hemoglobinurie masivă, stare de șoc, insuficiență renală și moarte.

În rare cazuri (5, 6) simptomatologia poate apărea după câteva minute de la inhalarea polenului de *Vicia fava*, cu hemoliză importantă și chiar hemoglobinurie.

Tratament. Tratamentul în cazul deficitului de G-6-PD are în special un caracter preventiv și constă din evitarea contactului cu acele substanțe (medicamentoase, chimice sau alimente) despre care se știe că pot declanșa hemoliză. De asemenea, este necesară evitarea, în măsura în

care acest lucru este posibil, a infecţiilor virale şi/sau bacteriene, precum şi tratarea lor (odată declanşate) în mod cât mai viguros şi complet.

În zonele în care frecvenţa deficitului eritrocitar de G-6-PD este ridicată, sfatul genetic poate avea un rol important în reducerea sau cel puţin stabilizarea numărului de persoane afectate.

Odată hemoliza declanşată şi în raport direct cu severitatea acesteia, se instituie un tratament corespunzător simptomatologiei (transfuzii — al căror scop principal este reducerea deficitului de oxigenare, controlul şi tratamentul specific al insuficienţei renale — în cazul în care aceasta s-a instalat ca urmare a hemoglobinuriei masive). Un aport bogat de lichide, precum şi administrarea de perfuzii abundente sunt de asemenea indicate pentru a preveni instalarea leziunilor tubulare renale.

La nou-născuţi, la care simptomele de hemoliză pot fi deosebit de severe, se recomandă aplicarea de exsanguinotransfuzii.

Spre deosebire de anemiile hemolitice congenitale de tip sferocitar, la purtătorii de variante anormale ale G-6-PD eritrocitare care determină hemoliză de mică intensitate, nu se recomandă splenectomie.

DEFICITUL ERITROCITAR DE PIRUVAT KINAZĂ

Deficitul eritrocitar de piruvat kinază (PK), care catalizează una dintre reacţiile majore responsabile de producerea ATP în glicoliză, este şi el o afecţiune care se transmite ereditar, caracterizată prin reducerea sau dispariţia din eritrocite a piruvat kinazei. Aceasta are drept efect o scădere a capacităţii de metabolizare a glucozei, a concentraţiei de adenozintrifosfat din eritrocite şi instalarea unei anemii hemolitice cronice de intensitate variabilă.

Frecvenţă. Deficitul de PK este mult mai rar decât cel de G-6-PD. Până în 1980, au fost descrise circa 300 de cazuri, fiind ca frecvenţă al doilea după deficitul de G-6-PD.

Patogenie. În anii '50, când interesul pentru anemiile hemolitice nesferocitare a sporit substanţial, în special ca urmare a studiilor asupra G-6-PD eritrocitare, s-a introdus în practica hematologică un test de laborator denumit *testul de autohemoliză*, care constă în incubarea timp de 48 de ore, în condiţii sterile, a unei cantităţi determinate de sânge defibrinat. Incubarea se face la 37°C, în prezenţa şi respectiv în absenţa glucozei, evaluându-se hemoliza spontană la terminarea incubării. Aplicarea acestui test a dus la împărţirea anemiilor hemolitice congenitale nesferocitare în două grupuri: anemii caracterizate printr-o autohemoliză ameliorată sau suprimată de adăugarea de glucoză la mediul în care are loc incubarea, denumite *anemii hemolitice congenitale nesferocitare* (AHCN) de tip I şi AHCN de tip II care, cu tot adaosul de glucoză în timpul incubării, prezintă un grad important de hemoliză spontană la terminarea testului.

În acest al doilea caz (AHCN de tip II) s-a constatat că eritrocitele sunt lipsite de capacitatea de a metaboliza glucoza până la stadiul de lactat şi prezintă o acumulare considerabilă de produşi intermediari ai metabolismului glucozei, în special de 2,3-difosfoglicerat (2,3-DPG).

Deficitul de PK împiedică desfășurarea normală a unei trepte importante a metabolizării glucozei, o treaptă în care ia naștere aproape o treime din cantitatea totală de energie de care are nevoie eritrocitul.

La originea tulburărilor clinice din acest defect enzimatic eritrocitar se află o leziune genetică manifestată fie prin sinteza diminuată a moleculelor de PK, fie prin scăderea eficienței moleculelor de enzimă sintetizate ca urmare a unor anomalii structurale, anomalii care reduc afinitatea enzimei pentru fosfoenol piruvat.

Deficitul se transmite ereditar, ca o trăsătură autosomală recesivă, ambele sexe fiind afectate în mod similar.

În alte țesuturi sau celule (ficat, mușchi striat, leucocite) enzima se găsește în cantități normale și are o activitate normală, ceea ce sugerează posibilitatea existenței mai multor gene specializate fiecare în dirijarea sintezei unui anumit tip de piruvat kinază.

Homozigoții pentru acest deficit enzimatic prezintă o anemie hemolitică cronică și splenomegalie, dar heterozigoții sunt normali hematologic.

Tabloul clinic depinde de intensitatea fenomenelor hemolitice, acestea fiind extrem de variabile în funcție de gradul în care deficitul poate fi compensat de mecanisme auxiliare (piruvat kinaza catalizează transformarea fosfoenol piruvatului în acid piruvic).

În câteva cazuri deficitul foarte sever a făcut ca supraviețuirea să fie posibilă doar prin administrarea de transfuzii periodice și/sau frecvente, dar la cei mai mulți dintre bolnavi anemia, deși mai importantă decât în cazul deficitului eritrocitar de G-6-PD, este tolerabilă, administrarea de sânge fiind necesară doar în cazurile în care hemoliza este intensificată de infecții sau de alte cauze (ca și în cazul altor defecte enzimatice eritrocitare nu s-a putut stabili o corelație satisfăcătoare între intensitatea deficitului și cea a manifestărilor clinice).

În cea mai mare parte bolnavii prezintă fie în perioadele de criză, fie în mod permanent, icter de intensitate variabilă și în aproape toate cazurile există un grad de splenomegalie. Ca și deficitul eritrocitar de G-6-PD, deficitul de PK eritrocitară poate determina la nou-născuți accidente hemolitice grave însoțite de icter nuclear, ce fac necesară aplicarea exsanguinotransfuziei.

Evoluția acestei afecțiuni este variabilă, în funcție de echilibrul care se instalează, în fiecare caz în parte, între intensitatea deficitului enzimatic și gradul de hemoliză. Printre eventualele complicații ale acestei tulburări, cea mai importantă este litiaza biliară — care poate de altfel să însoțească toate hemolizele cronice și care poate să facă necesară intervenția chirurgicală.

Tratamentul nu este specific ci numai simptomatic, corelat cu severitatea bolii. În unele cazuri grave splenectomia dă rezultate bune. Ea este indicată doar în acele situații în care administrarea de transfuzii este necesară pe o bază semipermanentă. După splenectomie se poate observa o creștere a reticulocitelor până la 50—70% (reticulocitoză paradoxală), datorită creșterii duratei lor de viață, odată înlăturată influența metabolică negativă a mediului splenic.

Anemia fiind cronică, cu evoluție îndelungată, pot apărea fenomene de hiporegenerare medulară, corectabile, în cea mai mare parte a cazurilor, prin administrarea unor doze adecvate de acid folic. O măsură de prevedere esențială este reducerea la minimum a transfuziilor pentru a preveni atât imunizările în cadrul sistemului OAB cât și riscul de hemocromatoză.

ALTE ENZIMOPATII ERITROCITARE

Alte eritroenzimopatii, implicând fie enzime din ciclul Embden—Meyerhoff, fie alte enzime, au fost descoperite în majoritate doar în ultimul deceniu și numărul cazurilor cunoscute este foarte redus.

Următoarele enzime din ciclul Embden—Meyerhoff (cu excepția piruvat kinazei) pot să prezinte deficite ce se însoțesc cu tulburări patologice: 1) hexokinaza (HK); 2) glucozo-fosfat izomeraza (GPI); 3) triozo-fosfat izomeraza (TPI); 4) fosfofructokinaza (PFK); 5) fosfo-glicero-mutaza (PGM); 6) 2.3-difosfoglicerat-mutaza (DPGM); dintre enzimele care, fără să aibă un rol în metabolizarea glucozei, pot provoca anemii hemolitice prin alte mecanisme, trebuie menționate glutation sintetaza (GSH-Sy), glutation peroxidaza (GSH-Px) și gama-glutamilcistein sintetaza. Deficitele acestor enzime sunt clinic similare cu deficiența G-6-PD.

În cazul enzimopatiilor eritrocitare determinate de deficite ale factorilor din ciclul Embdem—Meyerhoff, blocarea degradării glucozei și acumularea secundară de metaboliți intermediari duc la scurtarea duratei de viață a eritrocitelor, în timp ce defectele enzimatice care intervin în metabolismul glutationului (GSH) scad eficiența mecanismelor reductoare ale celulei în care este implicat acest tripeptid.

Exceptând fosfoglicero-mutaza, toate celelalte deficite enzimatice se transmit ca un caracter autosomal recesiv. Deficitul de PGM se transmite legat de sex, prin cromosomul X, bărbații fiind mai grav afectați decât femeile, în mod similar cu situația din cadrul deficitului de G-6-PD.

În ceea ce privește caracterele clinice ale acestor deficite, acestea sunt în general identice cu cele ale deficitului de PK și doar o analiză precisă a enzimelor eritrocitare permite o diferențiere a cazurilor și stabilirea precisă a diagnosticului.

În unele din aceste deficite simptomele hematologice sunt cu mult mai puțin importante decât cele observate la nivelul altor sisteme sau organe. Astfel, în deficitul de TPI tulburările neurologice sunt elementul predominant al tabloului clinic. Deficitul de PGM este asociat cu un grad variabil de subdezvoltare mintală. Deficitul de HK este comun tuturor celulelor din sânge și a fost observat în panmielopatia cu diverse malformații de organe, familială (tip Fanconi).

Un alt deficit enzimatic care duce la hemoliză este cel de pirimidină-5′-nucleotidază, enzimă care degradează nucleotizii pirimidinici în citidină și uridină, deficit în care până la 5% din eritrocite prezintă punctuații bazofile evidente. Purtătorii unui asemenea deficit moștenit prezintă o anemie hemolitică moderată.

În deficitele menționate se aplică aceleași indicații de tratament ca și în cazul deficitului de piruvat kinază. Cu toată raritatea lor, aceste deficite enzimatice trebuie suspectate în acele cazuri în care o investigare atentă a unei anemii hemolitice congenitale nesferocitare nu a permis încadrarea bolnavului în una din cele două mari categorii de deficite (deficitul de G-6-PD și deficitul de PK).

Odată definite prin reacții de identificare corespunzătoare, deficitele enzimatice eritrocitare ridică puține probleme, dar bolnavii trebuie avertizați asupra riscului pe care îl au, în special în legătură cu consumul de medicamente. Ei trebuie urmăriți, mai ales când este vorba de copii care au avut la naștere accidente hemolitice care sugerează posibilitatea ca un astfel de deficit enzimatic eritrocitar să existe și trebuie să se acorde o atenție deosebită triajului subiecților despre care se știe că au antecedente hematologice, pentru a se stabili cât mai precis posibil frecvența cu care astfel de deficite enzimatice eritrocitare se întâlnesc în anumite regiuni.

BIBLIOGRAFIE

1. ADAM A.: Nature 1961; 189: 686.
2. AFOLAYAN A., LUZZATTO L.: Biochemistry 1971; 10: 415.
3. ALLISON A. C.: Nature 1963; 197: 609.
4. BAUGHAN M. A. și colab.: Blood 1968; 32: 236.
5. BENÖHR H. C., WALLER H. D.: În Flohé L. (ed.): Glutathione, Edit. Thieme, Stuttgart, 1974.
6. BEUTLER E.: Br. J. Haematol. 1970; 18: 117.
7. BEUTLER E.: Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods, Edit. Grune & Stratton, New York, 1975.
8. BEUTLER E., DYMENT P. G., MATSUMOTO F.: Blood 1978; 51: 935.
9. BEUTLER E., YEH M., FAIRBANKS V. F.: Proc. Natl. Acad. Sci. 1962; 48: 9.
10. BISHOP C.: J. Biol. Chem. 1964; 239: 1053.
11. BLUME K. G. și colab.: Lancet 1968; 1: 529.
12. BOIVIN P., GALAND C., DREYFUS B.: Nouv. Rev. fr. Hématol. 1969; 9; 105.
13. CARSON P. E., FRISCHER H.: Am. J. Med. 1966; 41: 744.

13a. CECIL — Textbook of Medicine, Wyngaarden (Smith) Benneth, W. B. Saunders, Philadelphia, 1992, 862.

14. DAVIDSON R. G.: J. Pediat. 1964; 65: 765.
15. DE GRUCHY G. C.: Blood 1960; 16: 1371.
16. GAETANI G. F. și colab.: Br. J. Haematol. 1975; 32: 183.
17. GAETANI G. F. și colab.: Br. J. Haematol. 1979; 43: 39.
18. GORDON-SMITH E. C.: J. Clin. Path. 1974; 27 (suppl.): 128.
19. GRIMES A. J., LEETS I., DACIE J. V.: Br. J. Haematol. 1968; 14: 309.
20. HANEL H. K., PHILIP P.: Scand. J. Haematol. 1976; 17: 44.
21. KIRKMAN H. N., SCHETTINI F., PICKARD B. M.: J. Lab. clin. Med. 1964; 63: 726.
22. LUZZATTO L., USANGA E. A., REDDY S.: Science 1969; 164: 839.
23. LYON M. F.: Am. J. hum. Genet. 1962; 14: 135.
24. ODA S., ODA E., TANAKA K. R.: Clin. Res. 1977; 25: 344.
25. PAGLIA D. E., VALENTINE W. N.: Am. J. clin. Pathol. 1974; 62: 740.
26. SRIVASTAVA S. K., BEUTLER E.: Biochem. J. 1970; 119: 353.
27. TARLOV A. R. și colab.: Arch. intern. Med. 1962; 109: 209.
28. VALENTINE W. N. și colab.: Hematol. 1967; 276: 1.
29. YOSHIDA A.: Science 1973; 179: 532.
30. YUNIS J. J.: Academic Press, New York, 1969.

XXXIII

ANEMIILE HEMOLITICE PROVOCATE DE AGENȚI INFECȚIOȘI, CHIMICI SAU FIZICI

DAN COLIȚA

Grupul anemiilor hemolitice (AH) provocate de acțiunea unor agenți infecțioși, chimici sau fizici, asupra eritrocitelor nu constituie o entitate aparte, nici din punct de vedere patogenic, nici din cel al manifestărilor clinice. Prezentarea unui număr de anemii hemolitice într-un capitol separat, după criteriul etiologiei, prin diverși agresori antieritrocitari, este însă dictată de rațiuni practice. Deși sunt mult mai rare ca alte anemii hemolitice (de exemplu anemiile hemolitice autoimune) (12), acest grup de anemii capătă în ultimul timp o pondere tot mai mare, ca urmare a înmulțirii condițiilor de expunere profesională, a poluării crescânde a mediului și a îmbogățirii farmacopeii cu produse noi.

O parte din noțiunile incluse în acest capitol au fost tratate cu amănunte în alte părți ale tratatului. Ele vor fi amintite pe scurt, în măsura în care acest lucru devine necesar pentru accentuarea unor aspecte particulare. În schimb, se va insista asupra anemiilor hemolitice rezultate din distrugerea directă a hematiilor de către agenții menționați.

În tabelul 33.I sunt prezentați agenții etiologici care pot induce apariția de AH prin acțiune directă asupra eritrocitelor.

ANEMII HEMOLITICE PROVOCATE DE AGENȚI INFECȚIOȘI

Anemia hemolitică din malarie, boală endemo-epidemică, prezentă pe arii întinse ale globului, este cea mai răspândită anemie din acest grup.

Manifestările caracteristice ale infecției malarice sunt accesele febrile recurente, precedate de frisoane, splenomegalie, icter și anemie (8). Boala evoluează în puseuri, ritmate de ciclul de viață al hematozoarului.

TABELUL 33.I

Principalii agenți etiologici care provoacă AH prin acțiune directă asupra eritrocitelor

I. AGENȚI INFECȚIOȘI

1. Boli provocate de paraziți: Hematozoarul palustru
Bartonella bacilliformis
Toxoplasma gondii
Leishmania donoyani
Trypanosoma gambiense
Trypanosoma rhodesiense
Babesia microti

2. Virusuri: pneumonia atipică primară
mononucleoza infecțioasă

3. Bacterii: *Cl. Welchii, Diplococcus pneumoniae, Esch. coli, Haemophilus influenzae, Mycobacterium tuberculosis, Neisseria meningococcus, Salmonella, Streptococcus, Staphylococcus, Vibrio cholerae, Borrelia recurentis*

II. AGENȚI CHIMICI ȘI MEDICAMENTE

1. Toxice de membrană:
Cloroform, tetraclorură de carbon, benzen, toluen, tetra-decil-sulfat, digitonină, saponină, săpunuri cationice, veninul de cobra

2. Toxice cu activitate împotriva enzimelor globulare și/sau a hemoglobinei:
Aniline, acetanilida, nitriți, nitrați, clorați, nitrobenzenul, nitrotoluenul, fenacetina, sulfonamidele, primachina, pamachina, quinacrina, chinina, nitrofurantoina, furazolidona, izoniazida, analogi sintetici ai vitaminei K, fenilhidrazina, antipirina, piramidonul, naftalenul, probenecidul, cloramfenicolul, chinidina, substanțe vegetale (fasolea „fava"), plumb

3. Medicamente cu acțiune sensibilizantă:
Penicilina, chinidina, fenacetina, sulfonamidele, hidrazida, clorpromazina, insulina, rifampicina, metil-dopa, hidantoina

III. AGENȚI FIZICI

Căldura
Apa

Se cunosc patru specii de hematozoar adaptați omului: *Plasmodium malariae, falciparum, vivax* și *ovale*. Dezvoltarea intraeritrocitară a parazitului nu este stânjenită în mod natural, decât la purtătorii tarei de drepanocitoză, fenomen care este observat numai în infestarea cu *Pl. falciparum* (2). Anemia din malarie este, de regulă, normocitară și normocromă. Numărul reticulocitelor este ceva mai scăzut în infestările cu *Pl. vivax* și cu *Pl. falciparum*, care se localizează preferențial în eritrocitele tinere. Formele cele mai severe de anemie sunt observate în infecțiile cu *Pl. falciparum*.

Anemia din malarie este rezultatul acțiunii intricate a mai multor mecanisme (tabelul 33.II).

Anemia rezultă în mod direct din distrugerea globulelor roșii (hemoliză) și indirect prin asocierea unor mecanisme care afectează he-

TABELUL 33.II

Mecanismele care concură la inducerea anemiei din malarie

I. *Distrucție eritrocitară exagerată*

A. Prin mecanisme neimune
- — ruperea eritrocitelor infestate în circulație
- — sechestrarea și fagocitarea eritrocitelor în splină:
  - = selectivă:
    - • eritrocite infestate
    - • eritrocite cu defecte induse după „extragerea" paraziților din ele
  - = neselectivă (eritrocite parazitate și normale):
    - • hipersplenism (în cazurile cu splenomegalie importantă

B. Prin atașare de anticorpi și complement pe membrană (mecanismul „spectatorului inocent")

II. *Producție eritrocitară diminuată*

A. Eritropoieză ineficientă: carență de acid folic

B. Diseritropoieză

matopoieza (insuficiență medulară relativă). Hemoliza din malarie este mixtă: intra- și extravasculară. *Liza intravasculară* este produsă de către paraziții care și-au desăvârșit ciclul intraeritrocitar. Odată cu spargerea celulei sunt deversați în circulație paraziții (care vor infesta alte hematii), produse toxice ale acestora (ceea ce determină apariția puseurilor febrile) și hemoglobină (care produce blocarea haptoglobinei, hemoglobinemie și hemoglobinurie latentă). *Hemoliza extravasculară* are loc cu predominanță în splină, unde sunt reținute o parte din eritrocitele parazitate. Unele dintre acestea sunt fagocitate pe loc. Asupra altora operează un mecanism de „extragere" a paraziților, fără distrugerea imediată a celulelor, efectuat de macrofage. Aceste globule rămân, însă, cu cicatrice rigide ale membranei, se sfericizează și prezintă o susceptibilitate crescută la sechestrare și liză, în momentul reîntoarcerii lor în splină. Rezultatul acestui proces este icterul, creșterea bilirubinemiei indirecte și apariția urobilinogenuriei. La bolnavii cu malarie cronică se produce cu timpul hipertrofia splinei, ca rezultat al hiperplazierii populației de celule macrofage și a pulpei roșii, iar sechestrarea neselectivă de eritrocite, parazitate și neparazitate, va crește progresiv contribuind la accentuarea anemiei prin fenomenul de hipersplenism.

Recent s-a demonstrat în serul bolnavilor prezența unor anticorpi din clasa IgG cu specificitate față de antigene solubile ale parazitului. Complexele antigen-IgG, formate în plasmă, se atașează pasiv pe membrana eritrocitară, unde fixează componente ale complementului (C_3 în

special). Aceste eritrocite „sensibilizate" sunt mai expuse la fagocitoză intrasplenică. În zonele înalt endemice, testul Coombs direct poate fi pozitiv la circa 50% din copiii cu malarie cronică (5, 6).

Ca reacție la hemoliză, eritropoieza este intens stimulată. În formele cronice ale malariei se poate asocia o diseritropoieză severă (1) sau o ineficiență a eritropoiezei, secundară epuizării rezervelor de folați. Ambele mecanisme reduc producția de eritrocite și contribuie la accentuarea anemiei la bolnavii cu malarie (6).

Una din cele mai grave complicații ale infecției cu *Pl. falciparum* este accesul supraacut de hemoliză intravasculară. Acesta apare la bolnavi cu numeroase episoade de malarie în trecut și care au făcut repetate tratamente cu chinină. Febra, vărsăturile și hemoglobinuria apar după reluarea tratamentului. Ele se accentuează în câteva ore, ducând la prostrație și chiar la stare de șoc (febră bilioasă hemoglobinurică, febra de apă neagră). Nu este încă precizat rolul pe care-l joacă hematozoarul sau chinina în patogenia acestei complicații (12). În timpul crizei, parazitul nu este, de regulă, decelabil. La un număr de cazuri testul Coombs a fost pozitiv, sugerând intercalarea unui mecanism autoimun în care hematiile ar fi alterate în mod pasiv. Unele episoade au fost semnalate la purtători ai deficitului de glucoză-6-fosfat-dehidrogenază. Eliberarea masivă de tromboplastină din eritrocitele lizate în circulație, alterările toxice ale endoteliului vascular și activarea complementului, concurează la instalarea unor episoade de coagulare intravasculară diseminată, care se pot complica cu alterări cerebrale, insuficiență renală acută, edem pulmonar, hemoptizii sau manifestări hemoragipare sistemice. Mortalitatea este ridicată. Sunt indicate terapia antimalarică și măsurile de echilibrare, urmate în caz de eșec de exsanguinotransfuzie, eventual de hemodializă. Heparinoterapia se administrează cu prudență, eficiența ei fiind mult pusă la îndoială.

Diagnosticul malariei poate fi stabilit numai prin demonstrarea prezenței paraziților în sângele bolnavilor. Testul de rutină este examenul picăturii groase de sânge periferic, recoltate în timpul puseului febril. Descrierea detaliată a morfologiei hematozoarului poate fi găsită în lucrări de specialitate (8). Morfologistul neavizat poate confunda parazitul cu trombocite suprapuse peste eritrocite. Acestea nu posedă însă structură nucleară și sunt înconjurate de un halou luminos. În plus, monocitele circulante pot prezenta imagini de eritrofagocitoză și pigment malaric cu valoare sugestivă pentru diagnostic (6).

Toxoplasma gondii provoacă infecții grave, manifeste sau latente, la adulți și la copii.

Calea de transmitere cea mai obișnuită este orală, iar infecțiile rămân în general inaparente. Subiecții imunodeprimați (bolnavii de SIDA, cei tratați cu citostatice pentru leucemii și limfoame, receptorii de transplant) pot face însă boala acută, fie după infecția primară, fie prin reactivarea unei infecții latente preexistente (6). Toxoplasmele pot să străbată placenta. Produsul de concepție nu este viabil decât în cazurile în care infestarea s-a produs la sfârșitul sarcinii (8). Atât în forma congenitală, cât și în cea a adultului, s-au semnalat anemie hemolitică și eritroblastoză pronunțată (12). Toxoplasmele pot fi uneori identificate în

frotiurile de sânge periferic. Diagnosticul de certitudine se bazează însă pe inoculare la cobai și pe teste serologice.

Leishmanioza viscerală. Semnele cele mai frecvente sunt febra, anemia cu neutropenie și splenomegalia. Anemia cea mai severă se observă în forma adultului (kala-azar, leishmanioza indiană) și în forma infantilă mediteraneană.

Mecanismele care explică anemia sunt: sechestrarea splenică, inhibația unor enzime eritrocitare și producția unor hemolizine de către leishmanii. Autoaglutinarea este frecvent asociată titrurilor ridicate de IgG (6). Parazitul poate fi decelat, uneori, în punctatele medulare sau splenice (8).

Trypanosomiaza africană provoacă distrucția eritrocitelor prin mai multe mecanisme: eliberare de hemolizine de către paraziți, fagocitarea eritrocitelor care au absorbit pe suprafață complexe imune circulante alcătuite din IgM+antigene parazitare, sechestrare în splinele voluminoase, episoade de coagulopatie de consum (6).

Babesia microti este un protozoar răspândit printre rozătoare (în S.U.A. mai ales), care se transmite omului prin căpușe. Recent s-au descris și îmbolnăviri posttransfuzionale (7). Infecția umană poate fi latentă sau manifestă, ca anemie hemolitică febrilă de intensitate medie sau, mai rar, severă (când se poate complica cu insuficiența renală acută). Formele severe au fost uneori observate după splenectomie și necesită exsanguinotransfuzie. Diagnosticul poate fi sugerat de descoperirea parazitului în eritrocitele circulante sub forma unei incluzii anulare (asemănătoare *Pl. falciparum)* și este confirmat după inocularea intraperitoneală a hamsterului cu sânge de bolnav (în 48 de ore animalul face o boală gravă cu prezența intraeritrocitară a parazitului) (9).

Infecțiile virale și bacteriene. Majoritatea provoacă anemie hemolitică prin mecanisme imune. Virozele (mononucleoză infecțioasă, pneumonia atipică primară) induc formarea de aglutinine la rece. Celelalte tipuri de infecții menționate în tabelul 33.I pot induce hemoliză prin diverse mecanisme: liza sau simpla alterare a membranei eritrocitare de către unele toxine, mecanismul „spectatorului inocent" (eliminarea eritrocitelor pe care s-au atașat pasiv antigene microbiene și anticorpi), fragmentarea eritrocitară în cazurile complicate cu sindrom de coagulare intravasculară diseminată (6, 12).

Infecția cu *Clostridium welchii* provoacă hemoliză prin acțiune directă împotriva eritrocitelor: germenul eliberează o toxină (lecitinaza) care prin combinarea cu lipidele din membrana hematiilor, formează lizolecitine cu acțiune hemolitică. Unele cazuri se complică cu sindrom de coagulare intravasculară diseminată. Ambele mecanisme explică tipul hemolizei (intravascular) și caracterul ei progresiv și grav. Septicemia cu *Cl. welchii* se observă, de regulă, după manevre abortive. Antibioterapia energică, suprimarea focarului septic, exsanguinotransfuzia, hemodializa (în cazurile complicate cu insuficiență renală acută), eventual heparinoterapia prudentă, pot duce la vindecare (3, 12).

Bartonella bacilliformis este un cocobacil răspândit în special în Peru și produce la om o boală foarte gravă („febra de Oroya"). Hemoliza este

rezultatul distrugerii în splină a eritrocitelor infestate. S-au citat cazuri la care s-a asociat hemoliza microangiopatică (3). Boala poate fi vindecată prin administrarea de penicilină (12).

ANEMII HEMOLITICE PROVOCATE DE AGENȚI CHIMICI

Schematic, agenții toxici hemolitici (chimici și medicamentoși) pot acționa asupra hematiilor prin patru mecanisme: a) acțiune directă asupra constituenților membranei celulare; b) interferarea și/sau suprasolicitarea unor mecanisme enzimatice celulare; c) prin mecanisme neoxidative; d) prin mecanisme imunologice.

a) *Acțiunea directă a substanțelor toxice asupra constituenților membranei eritrocitare* poate fi urmarea absorbției pasive sau a combinării cu lipoproteinele acesteia. Rezultă o alterare a permeabilității și elasticității membranei. Se produce atât difuziunea extracelulară a hemoglobinei și a altor constituenți celulari, cât și pătrunderea apei și a sodiului în celulă. Hematiile capătă forme „prelitice" care pot fi observate pe frotiuri (sferocite, hematii crenelate). Diminuarea elasticității membranei face ca rezistența sa la confruntările mecanice la care este supusă continuu în torentul circulator să scadă. Hemoliza indusă de toxicele de membrană este direct proporțională cu doza și cu durata expunerii. Substratul asupra căruia acționează agentul hemolizant a putut fi precizat în câteva cazuri (4): cloroformul, tetraclorura de carbon, benzenul, toluenul acționează asupra grupărilor polare ale lanțurilor lipidice; detergenții anionici (tetra-decil-sulfatul) se fixează pe cefaline; substanțe vegetale (digitonina, saponina) și unele săpunuri cationice se combină cu colesterolul; veninurile de șarpe (cobra) transformă lecitina în lizolecitină.

b) *Un grup de substanțe interferează și/sau suprasolicită mecanisme enzimatice celulare.* Drogurile „oxidante" pot acționa asupra eritrocitelor normale solicitând până la epuizare mecanismele de menținere a hemoglobinei în stare redusă (sistemul dependent de reducerea glutationului). Rezultă formarea succesivă a methemoglobinemiei, a sulfhemoglobinei și a corpilor Heinz. Efectul substanțelor oxidante este înlesnit în prezența unui defect congenital de glutation reductază, sau în cazul existenței unei hemoglobine instabile (Hemoglobina H sau Zürich). Dintre substanțele methemoglobinizante amintim: anilina, acetanilida, nitriții și nitrații, clorații, nitrobenzenul, nitrotoluenul, fenacetina, sulfonamidele.

Un loc aparte îl ocupă anemia hemolitică apărută după expunerea la oxigen pur. Ea a fost semnalată la astronauți și ar fi consecința peroxidării lipidelor eritrocitare (12).

Un număr de substanțe provoacă hemoliză la indivizii cu deficiență ereditară de glucozo-6-fosfat-dehidrogenază (G6PD): primachină, pamachină, quinacrină, chinină, sulfonamide, sulfone, nitrofurantoină, furazolidonă, acetanilidă, fenacetină, antipirină, piramidon, naftalen, probenecid, analogi sintetici ai vitaminei K, fenilhidrazină, izoniazidă, trinitrotoluen, cloramfenicol, albastru de metil, chinidină, substanțe vegetale

(fasolea „fava"). Este de remarcat faptul că o parte din drogurile care provoacă methemoglobinizarea au capacitatea de a induce hemoliza și la persoanele cu deficiență de G6PD. Acest lucru este urmarea faptului că G6PD intervine ca regenerator al NADPH. Acest compus servește ca donator de hidrogen în menținerea unor niveluri adecvate de glutation redus, care la rându-i protejează grupările sulfhidrice celulare, împotriva alterărilor oxidative de cauză internă sau produse de droguri.

c) *Hemolize induse de substanțe chimice prin mecanisme neoxidative* (12). Episoade acute de hemoliză intravasculară pot fi produse în intoxicațiile cu hidrogen arseniat, clorat de potasiu sau acid pirogalic.

Hidrogenul arseniat este fixat de hemoglobină sub o formă nevolatilă. Compușii rezultați în urma oxidării ar fi răspunzători de producerea hemolizei.

Expunerea poate fi accidentală sau ocupațională (gazul se degajează în cursul proceselor de galvanizare, sudură sau gravură).

Puseurile de hemoliză pot fi depășite cu ajutorul exsanguinotransfuziilor.

Cuprul anorganic se acumulează în eritrocite, provocând inactivarea unor enzime ale căilor glicolitice, oxidarea hemoglobinei și alterarea membranei externe. Anemia hemolitică prin acest mecanism a fost semnalată după expunerea la sulfat de cupru, ca accident rar, după hemodializă sau în cadrul manifestărilor degenerescenței hepatolenticulare (boala Wilson).

Anemia din saturnism ocupă un loc aparte, prin complexitatea și specificitatea mecanismului de producere. Plumbul afectează sinteza hemoglobinei la toate cele trei niveluri de bază ale acesteia: inhibă sinteza hemului, unirea fierului cu protoporfirina și sinteza globinei. Efectul plumbului asupra sintezei hemului determină anomalii ale metabolismului porfirinelor prin blocarea activității unor enzime mitocondriale bogate în grupări -SH: dehidraza acidului deltaaminolevulinic (AAL) și hemisinteza (1 bis). Inhibiția activității AAL dehidrazei împiedică sinteza porfobilinogenului (PBG) din AAL. Excesul de AAL este eliminat în urină. Blocarea activității hemisintetazei împiedică încorporarea fierului în protoporfirină. Rezultă o acumulare considerabilă de protoporfirină liberă în eritrocite (500—600 g/100 cm^3) (4) și de fier neutilizat în mitocondrii. Intoxicația cu plumb determină și eliminări urinare crescute de coproporfirină III (1—2 mg/zi) (4), datorite, probabil, lipsei de utilizare a acestui precursor. Efectul plumbului asupra globinei se traduce prin alterări similare celor din talasemia minimă. Aproximativ 15% din pacienți pot prezenta creșteri ale procentajului de hemoglobină A_2 și F (1 bis).

Intoxicația cu plumb este o boală frecventă. Ea este semnalată la zețari, tipografi, vopsitori, mineri, consumatori de băuturi alcoolice distilate în alambicuri improvizate etc.

Semnele clinice dominante sunt: paloarea, colicile abdominale și manifestările neurologice (polinevrită, tulburări de comportament encefalopatie).

Semnele hematologice sunt dominate de anemie, care are caracter hipocrom și ușor microcitar (12). Un număr de eritrocite prezintă punctații bazofile. Frecvența eritrocitelor cu punctații nu este legată de intensitatea expunerii la toxice. Numărul de reticulocite este mărit, mai

ales în intoxicația rapid instalată. Mai pot fi constatate pe frotiurile de sânge periferic normoblaști, eritrocite cu corpi Jolly și inele Cabot (mai rar). Măduva osoasă prezintă hiperplazie eritroidă. La un număr de cazuri s-a semnalat prezența de eritroblaști multinucleați (10) sau de sideroblaști inelari (12). Durata de viață a eritrocitelor este ușor scăzută. *Turnover*-ul fierului plasmatic este ușor redus. Se observă o eliminare crescută de pigmenți biliari. Aspectele de mai sus pot sugera o eritropoieză ineficientă (12). Aceste date înmănunchiate au determinat pe unii cercetători să încadreze anemia saturniană în grupul anemiilor sideroblastice (10).

Diagnosticul este precizat de constatarea eliminărilor urinare crescute de AAL și coproporfirină III (testul de triaj) și a unei concentrații anormale de plumb în sânge și în urină. În intoxicațiile latente, în care nu se poate evidenția prezența toxicului prin probele de triaj, diagnosticul poate fi orientat de cercetarea protoporfirinei eritrocitare: nivelurile normale exclud existența intoxicației (11). Cercetarea plumburiei după administrarea unei cantități de EDTA constituie o altă modalitate de precizare a diagnosticului (1 bis).

După administrarea de chelatori (BAL, EDTA), se obține o normalizare rapidă a tulburărilor metabolismului porfirinelor, dar scăderea duratei de viață nu se repară până când nu sunt înlocuite eritrocitele defecte cu altele normale (12). Cifra de hemoglobină se normalizează după câteva săptămâni.

d) *Hemolize postmedicamentoase induse prin mecanisme imune* sunt, în general, rareori observate, în comparație cu numărul mare al bolnavilor tratați. Ele pot fi provocate de apariția unor anticorpi (Atc) cu acțiune antidrog sau cu specificitate împotriva unor antigene (Atg) eritrocitare. În tabelul 33.III sunt reproduse medicamentele ce pot provoca hemoliză imună și mecanismele apariției acesteia.

TABELUL 33.III

Medicamente care provoacă anemie hemolitică imunologică

A. HEMOLIZA REZULTATĂ DIN ACȚIUNEA ANTIDROG A ANTICORPILOR
(Atc serici acționează *in vitro* cu eritrocite normale numai în prezența medicamentului)

Medicamentul	Mecanism fiziopatologic	Sediul hemolizei
1. Penicilină Cefalosporine	*Mecanism haptenă-celulă* Drogul formează complexe cu elemente ale membranei celulei. Atc antidrog (IgG) învelesc eritrocitul și duc la liză, cu participarea complementului	Extravascular
2. Stibophen, Chinidină, Fenacetină, Antistin, Sulfonamide, HIN, Clorpromazină, Melphalan, Insulină, Rifampicin	*Mecanism prin complexe imune* Drogul formează complexe imune cu albumine și se atașează pe hematii împreună cu complementul (imunoaderență). Hemoliza se produce prin activarea complementului de către Atc (IgM sau IgG)	Intravascular

(Continuare tabelul 33.III)

B. HEMOLIZA REZULTATĂ DIN ACȚIUNEA ANTIHEMATIE A ANTICORPILOR
(Atc serici acționează *in vitro* cu eritrocite normale și în absența medicamentului)

Medicamentul	Mecanism fiziopatologic	Sediul hemolizei
Metil-dopa Ac. mefenamic Hidantoină Deseril Clorpromazină	*Autoimun* Auto-Atc de tip IgG au specificitatea anti-Rh. Mecanismul de producere nu este complet elucidat Hemoliza încetează după oprirea administrării medicamentului	Extravascular

(după Worlledge, 1973, modificat) (13)

ANEMII HEMOLITICE PROVOCATE DE AGENȚI FIZICI

În arsurile severe se observă totdeauna asocierea unei anemii hemolitice precoce, a cărei intensitate este proporțională cu suprafața corporală afectată. Se consideră că factorul care duce la fragilizarea eritrocitelor este încălzirea exagerată a sângelui. Hemoliza se produce intravascular. Hemoglobinuria este constată la majoritatea pacienților care au suferit arsuri ce depășesc 15% din suprafața corporală (12). Pe frotiul de sânge recoltat în primele 24—48 de ore după accident, pot fi observate schizocite și sferocite. Semnele de hemoliză se șterg după 48 de ore de la producerea arsurii, dar anemia persistă mai multe săptămâni.

Pătrunderea accidentală a apei în circulație, citată ca accident rar, după spălături vezicale efectuate în cursul prostatectomiei transuretrale sau la persoane salvate de la înec, poate determina o hemoliză osmotică.

BIBLIOGRAFIE

1. ABDALA S., WEATHERALL D. J., WICKRAMASINGHE S. N., HUGHES M.: Crit. J. Haematol. 1980; 46: 171.
1bis. ALBAHARY C.: Amer. J. Med. 1972; 32: 369.
2. ALLISON A. C.: Exp. Parasit. 1957; 6: 418.
3. BEUTLER E.: În WILLIAMS W. J., BEUTLER E., ERSLEV A. J., LICHTMAN M. A. (eds.): Hematology, McGraw-Hill Book Company, New York, 1990, cap. 65, 66.
4. DOUSTE-BLAZY L., BIERMÉ R.: Rev. Prat. 1967; 17: 2449.
5. FACER C. A.: Clin. Exp. Immunol. 1980; 39: 279.
6. FLEMING A. F.: Clin. Haematol. 1981; 10: 983.
7. JACOBY G. A., HUNCT J. V., KOSINSKI K. S. și colab.: New Engl. J. Med. 1980; 303: 1098.
8. NITZULESCU V., GHERMAN I., FELDIOREANU T.: Parazitologie clinică, Ed. Medicală, București, 1964, 75.
9. ROCHANT H.: În DREYFUS B., BRETON-GORIUS J., ROCHANT H., TEYES F., VERNANT J. P. (eds.): Hématologie, Edit. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1986, 334.

10. VALENTINE W. N.: în WILLIAMS W. J., BEUTLER E., ERSLEV A. J., LICHTMAN M. A. (eds.): Hematology, McGraw-Hill Book Company, New York, 1983, 537.
11. TSCHUDY D. P.: în WILLIAMS W. J., BEUTLER E., ERSLEV A. J., LICHTMAN M. A. (eds.): Hematology, McGraw-Hill Book Company, New York, 1983, 691.
12. WINTROBE M. N., LEE G. R., BOGGS D. R., BITHELL T. C., ATHENS J. W., FOERSTER J.: Clinical Hematology, Lea-Febiger, Philadelphia, 1981, cap. 39, 949.
13. WORLLEDGE S. M.: Semin. Hematol. 1973; 10: 327.

XXXIV

ANEMIILE HEMOLITICE PRIN FRAGMENTARE ERITROCITARĂ

ADRIANA COLIȚĂ

Fragmentarea eritrocitelor poate apărea datorită expunerii lor la traume fizice excesive în interiorul aparatului cardiovascular. Condițiile patologice însoțite de anemie hemolitică cu fragmentare intravasculară a eritrocitelor sunt: 1) boli ale vaselor mici (anemia hemolitică microangiopatică); 2) boli ale inimii și vaselor mari. Cele două grupe de boli diferă în ceea ce privește etiologia, patogenia, prognosticul și terapia hemolizei mecanice (19, 22, 31).

Eritrocitul fragmentat (schistocitul, keratocitul), *semnalul* prezenței unui proces de hemoliză mecanică, este un eritrocit care și-a pierdut o parte din învelișul de suprafață ± o porțiune de citoplasmă, care și-a cicatrizat membrana și care persistă pentru un timp în circulație până când va fi îndepărtat de macrofage. Eritrocitul fragmentat are o formă caracteristică: coif, semilună, triunghi, microsferocit. Anemia hemolitică cu fragmentare eritrocitară este un exemplu al legăturii „fascinante" dintre forma eritrocitelor și mecanismul de bază al hemolizei.

ANEMIA HEMOLITICĂ MICROANGIOPATICĂ

Definiție, delimitare, istoric. Anemia hemolitică microangiopatică (AHM) este un sindrom caracterizat prin semne de hemoliză intravasculară și prezența de eritrocite fragmentate pe frotiul de sânge. AHM se însoțește frecvent de trombocitopenie și tulburări de coagulare. Sindromul a fost descris în asociere cu boli ale vaselor mici de sânge (arteriole și capilare). AHM apare ca urmare a unei *leziuni a endoteliului vascular* (însoțită sau nu de depunere locală de fibrină și/sau trombocite) sau a unui *proces de coagulare intravasculară diseminată* (CID) (3, 6, 22, 31, 32).

Lista afecțiunilor în care a fost descrisă AHM este prezentată în tabelul 34.I.

În 1881, Ehrlich a observat prezența de eritrocite fragmentate (schistocite) pe frotiul bolnavilor cu anemie. În 1949, Schwartz și Motto au descris eritrocite crestate *(burr cells)* pe frotiul bolnavilor cu uremie, cancer gastric, ulcer peptic hemoragic. În 1954, Monroe și Strause au obser-

TABELUL 34.I

Afecțiuni asociate cu AHM

I. MICROANGIOPATII TROMBOTICE*
1. Purpura trombocitopenică trombotică (PTT)
2. Sindromul hemolitic uremic
3. Asociată cu HTA
   — Hipertensiune malignă
   — Preeclampsie, eclampsie
4. Asociată cu afectare imună a vaselor mici
   — Lupus eritematos sistemic
   — Poliarterită nodoasă
   — Granulomatoză Wegener
   — Sclerodermie
   — Glomerulonefrită acută
   — Rejecția de homografe (renale, hepatice)
5. Asociată cu malignitate
   — Adenocarcinoame (stomac, sân, plămân)
   — Limfoame maligne
6. Asociată cu medicamente și/sau iradiere
   — Agenți antineoplazici (Mitomicină C, Cisplatin, Bleomicin)
   — Nefrită postiradiere și chimioterapie în transplant de măduvă osoasă
7. Asociată cu malformații congenitale vasculare
   — Hemangiom cavernos (S. Kasabah Meritt)
   — Hemangioendoteliom hepatic

II. COAGULARE INTRAVASCULARĂ DISEMINATĂ (CID)
1. *Abruptio placentae*
2. Administrarea de preparate de FIX „activate"
3. Leucemie acută promielocitară
4. Mușcătură de șarpe
5. Septicemii
6. Reacții hemolitice posttransfuzionale
7. Sindrom de *distress* respirator al adultului
8. Pancreatite
9. Șoc prin căldură
10. Reacții alergice la medicamente

* Boli ale vaselor mici adesea asociate cu coagulare intravasculară localizată sau consum izolat de trombocite.

vat eritrocite fragmentate pe secțiunile unor vase de sânge la un pacient care a murit cu purpură trombocită trombocitopenică (PTT).

În 1952, Symmers a introdus termenul de „anemie hemolitică microangiopatică trombotică" pentru a descrie PTT.

În 1962, Brain, Dacie și Hourihane au folosit denumirea de „anemie hemolitică microangiopatică" pentru a descrie anemia hemolitică cu fragmentare eritrocitară observată la pacienții care la biopsie sau necropsie prezentau alterări patologice ale vaselor mici (necroză fibrinoidă, arte-

rită necrozantă, trombi hialini în arteriole și capilare, emboli tumorali) (3). Între 1962 și 1972, Brain și Dacie în colaborare cu alți cercetători au produs experimental AHM la animale, au studiat mecanismul fragmentării eritrocitelor *in vitro*, au descris prezența coagulării intravasculare la pacienții cu AHM, răspunsul la tratamentul cu heparină și asocierea AHM cu cancerul metastatic.

În ultimii ani a fost introdus termenul de *„microangiopatie trombotică"* pentru a descrie sindroame caracterizate prin anemie hemolitică cu fragmentare eritrocitară, trombocitopenie, leziuni trombocite în vasele mici de sânge (27). Grupul microangiopatiilor trombotice cuprinde purpura trombocitopenică trombotică (PTT), sindromul hemolitic uremic (SHU) și microangiopatii secundare asociate cu boli prin complexe imune, malignitate, agenți antineoplazici.

Etiopatogenie. În cazurile în care se produce o alterare a endoteliului vascular, primară sau secundară unui proces de coagulare intravasculară, trombii de fibrină și trombocite pot oblitera parțial lumenul vaselor mici. Filamentele de fibrină acționează asupra eritrocitelor în mișcare într-un mod asemănător unei „ghilotine" și provoacă fragmentarea lor. Unele eritrocite fragmentate, care nu au suficientă membrană de suprafață în raport cu volumul, sunt rapid sechestrate de macrofagele splenice. Altele, cu raport suprafață/volum mai mare decât normal (prin pierderea de hemoglobină în plasmă sau ca urmare a fragmentării) mai persistă un timp în circulație după ce suferă un proces de cicatrizare („repecetluire") a membranei și reprezintă „cheia diagnosticului" pentru boala de bază. Ca urmare a acestui proces de cicatrizare a membranei apar eritrocite rigide: sferocite, eritrocite în coif care vor suferi o nouă fragmentare la trecerea prin capilare. Fragmentarea eritrocitelor este urmată de eliberarea de ADP și material procoagulant fosfolipidic, care duc la noi agregări de trombocite și noi depuneri de fibrină în vasele mici, amplificând procesul de coagulare intravasculară (32). În figura XXXIV.1 se prezintă

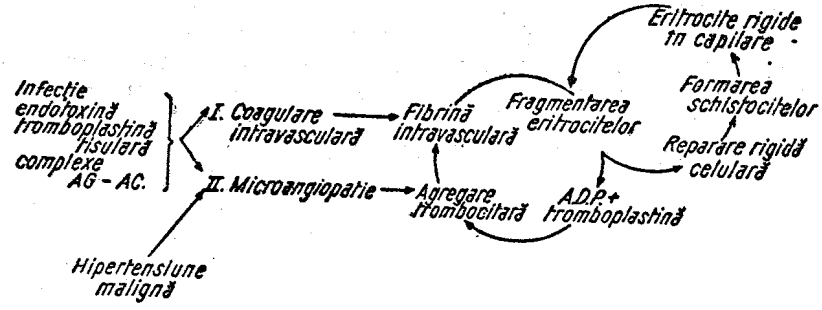


Fig. XXXIV.1. — Model pentru patogenia anemiei hemolitice microangiopatice (AHM).

un model pentru patogenia AHM. Nu toți pacienții cu coagulare intravasculară diseminată (CID) prezintă AHM; pentru apariția acesteia este important ca fibrina să persiste un timp suficient în circulație. Persistența depozitelor de fibrină în vasele mici depinde de: ritmul defibrinării, activitatea de *clearance* a sistemului macrofagic și fibrinoliza locală.

Rolul *depunerilor intravasculare de fibrină* pentru patogenia AHM este susținut de modele experimentale realizate *in vivo* pe animale. Inducerea la iepure a unui proces de coagulare intravasculară prin perfuzia de endotoxină (4) sau trombină (5) este urmată în momentul instalării trombozei glomerulare renale de apariția semnelor de hemoliză intravasculară și a eritrocitelor fragmentate în sânge. Administrarea heparinei înaintea perfuziei cu endotoxină sau trombină preîntâmpină apariția trombozei patului vascular renal și a hemolizei. Injectarea la iepure de Arvin (fracțiune coagulantă de venin de viperă) induce o defibrinare rapidă cu formare de trombi în diverse organe și hemoliză intravasculară tranzitorie datorită lizei rapide a depozitelor de fibrină. Administrarea de EAC prin inhibarea fibrinolizei duce la persistența trombilor de fibrină și la hemoliză continuă cu fragmentare eritrocitară marcată (36).

Mecanismul fragmentării eritrocitelor a fost elucidat prin modele *in vitro*. Astfel au fost înregistrate modificările eritrocitelor trecute forțat printr-un cheag lax de fibrină (8). Eritrocitele atașate sau îndoite pe benzile de fibrină erau fie eliberate, fie fragmentate prin forța fluxului sanguin. Forma și mărimea fragmentelor depindea de planul și poziția în care eritrocitele au fost oprite, de punctul de ruptură al membranei, de distribuția hemoglobinei și a membranei între fragmente. Înlocuirea cheagului de fibrină prin filamente de dimensiuni mici de sticlă sau nailon au dat aceleași rezultate. Două condiții joacă un rol în fragmentare: dimensiunile mici ale obstacolului și un flux sanguin rapid.

AHM este asociată cu o varietate de boli cunoscute a se complica cu CID incluzând septicemiile, *purpura fulminans, abruptio placentae,* leucemie acută promielocitară. Apariția eritrocitelor fragmentate este legată de prezența depozitelor de fibrină în vase mici și mecanismul hemolizei amintește modelele experimentale clasice.

AHM a fost descrisă la pacienți cu *cancere diseminate* (3, 29), dar incidența sa este rară (~5%). AHM asociată cu trombocitopenie, leucocitoză, deviere la stânga a formulei leucocitare, prezența de eritroblaști în sânge sugerează boală neoplazică diseminată. În 30% din cazuri diagnosticul de AHM precedă diagnosticul de cancer metastazat. Hemoliza este urmarea distrugerii mecanice a eritrocitelor în vasele mici de sânge modificate prin prezența de depozite de fibrină și/sau emboli tumorali (33). Tumorile producătoare de mucină sunt frecvent asociate cu CID, datorită eliberării pe lângă factorul tisular și a unei proteaze (cistein protează) care activează direct factorul X (20). Asocierea CID cu cancere metastazate este frecventă și se întâlnește la pacienți cu cancere de pancreas, de plămân și de prostată. AHM apare frecvent (>50%) la pacienții cu cancer gastric (33). Un mecanism posibil de fragmentare a eritrocitelor în cancerele gastrice este legat de prezența de emboli tumorali microscopici în circulația pulmonară cu proliferarea intimei arteriolelor pulmonare (2). Aceste modificări ale arteriolelor duc la hipertensiune pulmonară cu creșterea forțelor de forfecare la care sunt supuse eritrocitele și trombocitele.

Recent, AHM a fost descrisă în *sindromul hemolitic uremic postchimioterapie* care apare la bolnavii cu cancer (gastric, de colon, de sân) după întreruperea tratamentului (la 4—8 săptămâni). Pacienții sunt, în momentul apariției sindromului, în remisiune clinică (10, 43). Microangio-

patia trombotică este urmarea lezării endoteliului vascular de agenții chimioterapici (Mitomicină C, Bleomicină, Cisplatin, Daunorubicină) și este localizată predominant la nivelul rinichiului (9, 18). Leziunea endotelială poate fi provocată și de complexe imune circulante care conțin antigene tumorale care declanșează coagulare intravasculară la locul depunerii lor. În tabelul 34.II sunt rezumate aspecte caracteristice ale AHM asociate cu cancer metastazat și a sindromului hemolitic uremic post-chimioterapie.

TABELUL 34.II

Microangiopatia trombotică la pacienții cu cancer*

Aspecte distincte	AHM și cancer	SHU postchimioterapie
Cele mai frecvente localizări ale cancerului	Stomac, sân, plămân	Stomac, colon, sân
Statusul bolii	Cancer metastazat	Remisiune clinică
B/F	1,2 : 1	1 : 1,9
Sediul principal al microangiopatiei	Plămân	Rinichi
Insuficiență renală	Rară	Caracteristică
Hipertensiune severă	Rară	Frecventă
Edem pulmonar	Rar	Frecvent
Reacții adverse la transfuzii cu masă eritrocitară	Nu s-au descris	Frecvent
Tablou leucoeritroblastic	Obișnuit	Rar
Evidență de laborator de coagulare intravasculară	Obișnuită	Frecvent absentă
Factorii inițiatori	Factori derivați din emboli tumorali	Toxicitatea chimioterapiei + complexe imune circulante
Tratament recomandat	Terapie antineoplazică specifică ± heparină	Imunoperfuzie sau schimb de plasmă + medicamente antitrombocitare

* După A. J. Murga, 1987, 24 : 161.

Hemoliza intravasculară cu fragmentare eritrocitară a fost comunicată în unele *complicații ale sarcinii:* preeclampsie, eclampsie și *abruptio placentae.* În aceste sindroame s-a evidențiat un proces de CID cronică. Studiile efectuate au demonstrat: agregare trombocitară crescută, durată de viață scurtată a trombocitelor, consum de F VIII, scăderea antitrombinei III din plasmă, scăderea fibrinolizei (34, 41, 42). S-a constatat în plus creșterea concentrației de fibronectină în plasmă. Deși fibrinogenul este normal au fost demonstrate depozite de fibrină în rinichi și ficat (39). Apariția AHM este legată de prezența depozitelor de fibrină din vase mici și de hipertensiunea severă care apare în cele mai multe cazuri.

Asocierea *hipertensiunii maligne* cu hemoliză intravasculară a fost comunicată (în 1954) înainte de apariția conceptului de AHM. Patogenia hemolizei cu fragmentare în hipertensiunea malignă este puțin înțeleasă. Hemoliza este atribuită procesului de necroză fibrinoidă a peretelui arterial care apare ca urmare a hipertensiunii maligne (6, 11). He-

moliza agravează leziunile arteriolare prin inducerea de coagulare intravasculară. Formarea fibrinei este urmarea proprietăţilor procoagulante ale stromelor eritrocitelor distruse. AHM a fost descrisă la şobolani în cursul evoluţiei hipertensiunii maligne experimentale (40). Animalele cele mai anemice au fost cele care prezentau cele mai severe leziuni arteriale şi arteriolare. Studiile de microscopie electronică au evidenţiat eritrocite aderente la celule glomerulare şi parţial penetrate între endotelii. Forţa fluxului arterial exercită o tensiune de forfecare asupra eritrocitelor aderente sau penetrante ducând la fragmentarea lor. Normalizarea tensiunii arteriale duce la dispariţia AHM.

AHM reprezintă o caracteristică a *purpurei trombotice trombocitopenice* (PTT) şi a *sindromului hemolitic uremic* (SHU) (27).

PTT este o boală rară, care afectează adultul tânăr, caracterizată prin anemie hemolitică cu fragmentare eritrocitară, trombocitopenie şi o varietate de tulburări clinice incluzând manifestări neurologice, insuficienţă renală şi febră. Manifestările clinice şi de laborator sunt urmarea directă a leziunilor trombotice microvasculare. Diagnosticul PTT trebuie inclus în diagnosticul diferenţial al oricărui pacient cu hemoliză intravasculară şi fragmentare eritrocitară.

SHU este considerat ca o variantă a PTT în care microangiopatia trombotică cuprinde în special arteriolele şi capilarele glomerulare. Au fost identificate mai multe tipuri de SHU incluzând pe lângă formele primare, forme postinfecţioase, forme ereditare, forme complicând sarcina sau administrarea de medicamente antineoplazice (22). Leziunea endoteliului vascular reprezintă primul eveniment patogenic. În SHU celulele endoteliale sunt ţinta atacului unor toxine bacteriene: toxina Shiga (produsă de *Shigella dysenteriae*) şi verotoxina sau „*Shiga like toxin*" (produsă de o suşă de *E. coli* 0157:H7). Celulele endoteliale lezate sunt separate de membrana bazală şi trombocitele şi coagularea sunt activate prin contactul cu colagenul expus. Aderarea şi agregarea trombocitelor este mult accentuată prin eliberarea unor polimeri neobişnuit de mari de factor von Willebrand din endoteliul lezat, prin producerea de trombocite a unui agent agregant puternic şi vasoconstrictor (tromboxanul A_2—TXA_2) şi prin reducerea formării de prostaciclină (PGI_2) cu efect antiagregant şi vasodilatator de către endoteliul lezat. În SHU şi PTT s-a demonstrat un defect ereditar sau câştigat în metabolismul PGI_2: lipsa factorului plasmatic cerut de endoteliu pentru producţia de PGI_2; sinteza unui inhibitor al PGI_2; degradare crescută a PGI_2. Lumenul capilarelor şi arteriolelor este îngustat, ca urmare a tumefacţiei celulelor endoteliale lezate, a formării de trombi din trombocite (şi fibrină) şi a eliberării de substanţe vasoactive din trombocite. Eritrocitele sunt distruse prin contactul direct cu trombii de fibrină sau cu celulele endoteliale lezate. Toxinele bacteriene pot acţiona şi direct asupra eritrocitelor. Eritrocitele pot prezenta receptori pentru verotoxină formaţi din secvenţa terminală glucidică a unor antigene de grup sanguin (P_1 şi P_k); gradul hemolizei depinde de numărul acestor receptori pentru verotoxină de pe suprafaţa eritrocitelor. Neuramidaza (eliberată de *Streptococcus pneumoniae*) duce la eliberarea unor antigene ascunse (antigenele T—F) de pe suprafaţa eritrocitelor, trombocitelor, celulelor endo-

teliale şi a glicosubstanţelor din creier. Prezenţa în plasma unor pacienţi de IgM anti-T—F declanşează hemoliză şi provoacă trombocitopenie, injurie vasculară şi tromboze în vase mici (22).

AHM poate complica boli în care vasele mici sunt lezate prin *mecanism imun* (22, 27). Ea a fost descrisă la pacienţi cu vasculite şi lupus eritematos sistemic, poliartrită reumatoidă, sindrom Sjögren, micropoliarterită nodoasă, polimiozită, sclerodermie, granulomatoză Wegener, arterită cu celule gigante. Complexele imune circulante duc la activarea coagulării, probabil prin acţiunea asupra trombocitelor. Activarea coagulării este urmată de apariţia de depozite de fibrină care stimulează proliferarea celulelor endoteliale. Acestea sunt lezate şi de depunerea complexelor imune circulante. Fragmentarea eritrocitelor este urmarea depozitării de fibrină intravascular şi a modificărilor celulelor endoteliale.

Hemoliza intravasculară cu fragmentare eritrocitară a fost descrisă după *transplant de rinichi sau ficat* (21, 27, 28). Apariţia microangiopatiei trombotice în aceste cazuri este urmarea însumării efectului toxic al agenţilor imunosupresori, al leziunii induse de rejecţia tisulară, al prezenţei complexelor imune circulante, care contribuie împreună la lezarea endoteliului vascular.

Transplantul de măduvă osoasă (allogenic sau autolog) a fost urmat în unele cazuri de un tablou clinic asemănător celui din SHU sau PTT cu insuficienţă renală, anemie hemolitică cu fragmentare eritrocitară, trombocitopenie, semne neurologice, febră. Mecanismul patogenic pare legat de nefrita postiradiere şi de efectul toxic al agenţilor chimioterapeutici, utilizaţi pentru ablaţia măduvei înainte de transplant (23, 38).

O microangiopatie severă însoţită de AHM şi trombocitopenie a fost descrisă după profilaxia cu Ciclosporina A pentru boala acută grefă-contra-gazdă în transplantul de măduvă osoasă allogenă (25). Patogenia microangiopatiei este legată de activarea limfocitelor şi stimularea monocitelor în cursul bolii acute grefă-contra-gazdă. Monocitele secretă citokine (TNF şi IL-1) care produc lezarea endoteliului, activarea coagulării şi dezvoltarea microangiopatiei. Lezarea endoteliului pare a fi leziunea cea mai importantă şi este anunţată de creşterea F VIII antigenic.

Deşi majoritatea cazurilor de AHM sunt asociate cu boli difuze care afectează vasele mici, fragmentarea eritrocitelor poate apărea şi datorită unor *anomalii vasculare localizate*. Pacienţii cu hemangioame cavernoase cutanate şi cu hemangioendoteliom al ficatului pot prezenta AHM asociată cu coagulare intravasculară declanşată de malformaţia vasculară congenitală (1, 35).

Tabloul clinic. Manifestările clinice depind de boala primară care produce leziunile vasculare sau de organul afectat predominant de microangiopatia trombotică. Anemia poate fi severă datorită instalării brutale a hemolizei. Icterul este moderat. Splenomegalia este rară. Tulburările complexe ale hemostazei duc la apariţia de manifestări hemoragice.

Examene de laborator. AHM apare ca o complicaţie a unei boli cunoscute sau uşor de diagnosticat. În alte cazuri sindromul poate fi mani-

festarea de debut a unei boli inaparente care trebuie precizată. Suspiciunea de AHM apare atunci când la un bolnav cu anemie acută severă, icter și sindrom hemoragic se descoperă pe frotiul de sânge *eritrocite fragmentate* peste valoarea normală (>1%) (fig. XXXIV.2).

AHM se caracterizează printr-un *răspuns medular neobișnuit* la scăderea numărului de eritrocite din sânge. Triada reticulocitoză, leucocitoză, trombocitoză se transformă în triada reticulocitoză, leucocitoză și trombocitopenie prin consum. Un tablou leucoeritroblastic asociat cu eritrocite fragmentate este caracteristic AHM care complică un cancer metastazat (12, 13, 14, 15). Urmărirea zilnică a frotiului de sânge în leucemia acută promielocitară constituie un „semnal" pentru apariția depunerilor intravasculare de fibrină în cadrul CID (16, 17).

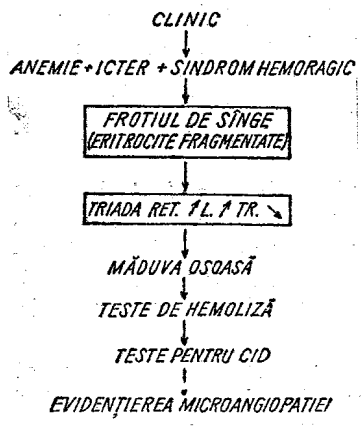


Fig. XXXIV.2. — Schema de investigare a unei AHM.

Măduva osoasă este bogată, cu hiperplazie marcată a seriei eritrocitare și megacariocitare. În unele situații, examenul măduvei osoase poate furniza chiar diagnosticul bolii de bază în caz de cancer, prin descoperirea cuiburilor de celule metastazate (fig. XXXIV.3).

Existența procesului de hemoliză intra- și extravasculară este dovedită de creșterea hemoglobinemiei, scăderea haptoglobinei, creșterea LDH, hemoglobinurie, hemosiderinurie, creșterea bilirubinemiei, indirecte și a urobilinogenului urinar. Uneori existența procesului de hemoliză este obiectivată numai de scurtarea duratei de viață a eritrocitelor marcate cu ^{51}Cr.

Diagnosticul pozitiv de AHM implică precizarea procesului patologic care afectează microcirculația: CID sau boală vasculară primară. La unii bolnavi anomaliile testelor de hemostază sugerează CID. Uneori consumul factorilor de coagulare nu poate fi dovedit decât prin investigații speciale: *turnover*-ul fibrinogenului marcat cu ^{131}I și al trombocitelor marcate cu ^{51}Cr. Informații privind starea vaselor mici se obțin prin diverse examene: fund de ochi, biopsie de piele, mușchi, rinichi, măduvă osoasă. Rinichiul poate fi uneori unicul sediu al microangiopatiei. În unele cazuri modificările vaselor mici și diagnosticul bolii de bază sunt precizate numai de necropsie.

Diagnosticul diferențial. Fragmentarea eritrocitelor apare și în alte anemii în care microcirculația nu este afectată, dar în care există un *defect intrinsec eritrocitar*, ca în talasemie, siclemie, anemii hemolitice cu corpi Heinz, favism. Eritrocitele fragmentate se pot observa și pe frotiul de sânge al bolnavilor cu *anemie feriprivă și macromegaloblastică.* AHM se deosebește de toate aceste anemii prin asocierea neobișnuită de AH și fragmentare eritrocitară, leucocitoză și trombocitopenie.

Evoluție, prognostic. Evoluția AHM se suprapune, adesea agravând-o, evoluției bolii vasculare primare sau procesului de coagulare intravasculară localizată sau diseminată. Când coagularea intravasculară joacă

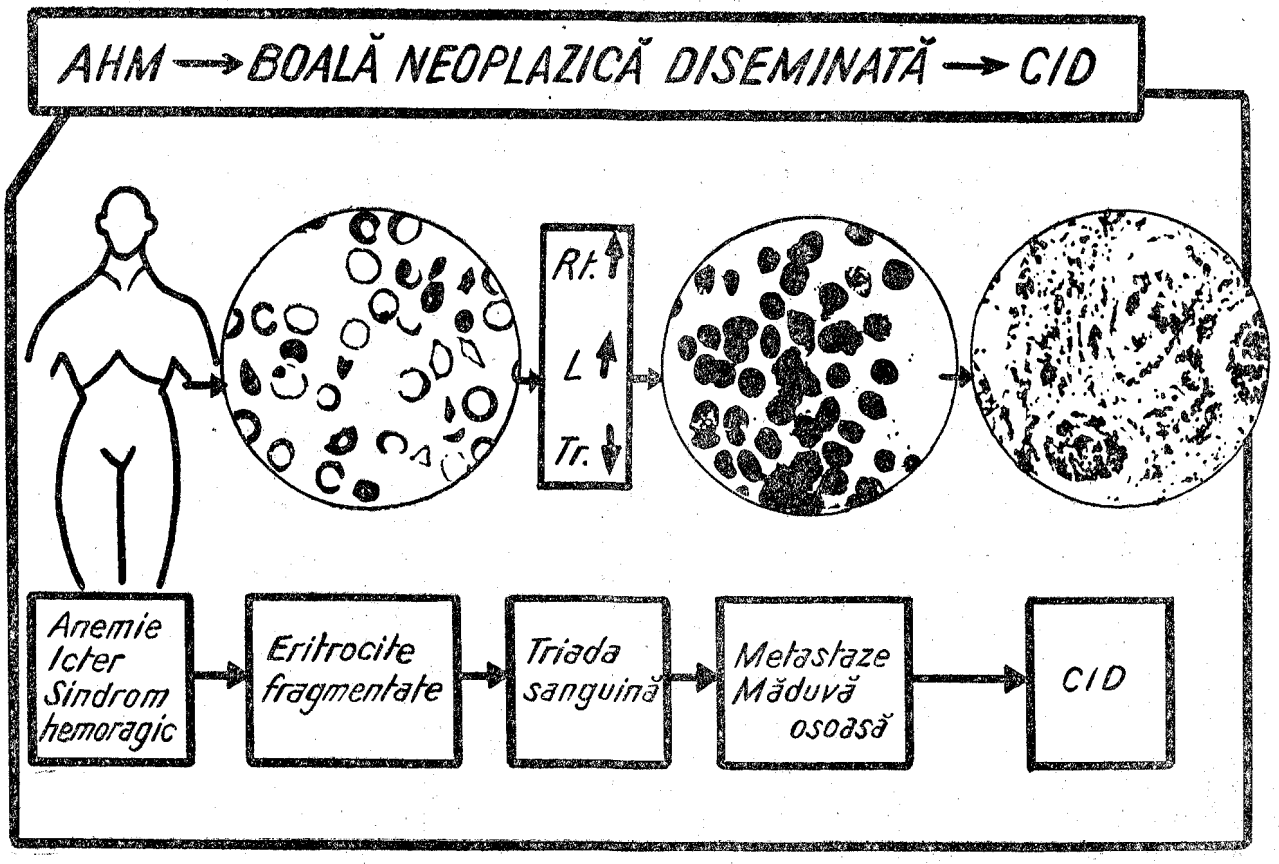


Fig. XXXIV.3. — Schemă care ilustrează etapele de diagnostic ale unei boli neoplazice diseminate asociate cu anemia hemolitică microangiopatică (AHM) și coagulare intravasculară diseminată (CID) (Coliță A. și colab., 1984).

un rol major, introducerea rapidă a terapiei anticoagulante salvează bolnavul. În cazurile în care există o afectare vasculară primară, evoluţia depinde de etiologia bolii vasculare.

Tratament. Obiectivele tratamentului sunt: a) corectarea bolii de bază şi/sau a unor mecanisme patogenice primare; b) întreruperea procesului de coagulare intravasculară sau a consumului izolat de trombocite; c) corectarea anemiei.

a) Tratamentul bolii de bază este o problemă dificilă în unele situaţii care se complică cu AHM. Într-o serie de afecţiuni (PTT, SHU) factorii etologici ai procesului patologic fundamental sunt necunoscuţi; în acest caz se recurge numai la un tratament patogenic sau simptomatic. Introducerea unor mijloace de terapie noi în PTT şi SHU cu plasmafereză cu schimb de plasmă sau perfuzii cu plasmă proaspătă, pe lângă corticoterapie şi agenţi inhibitori ai funcţiei plachetare, au dus la creşterea procentului de supravieţuiri (~70%) (7, 27). Recent, agenţii imunosupresivi (Vincristina) s-au dovedit utili în tratamentul PTT. La bolnavii cu hipertensiune malignă şi AHM, scăderea tensiunii arteriale prin medicaţie adecvată poate duce la încetarea hemolizei şi corectarea anemiei.

b) Terapia cu heparină aduce un beneficiu în cazurile de CID când este aplicată timpuriu, înainte de producerea leziunilor ireversibile, în special renale. Anticoagulantele orale par ineficiente în tratamentul AHM. Inhibitorii funcţiei trombocitelor (dextran, aspirină, dipiridamol, sulfinpirazonă) au fost administraţi cu succes la unii bolnavi cu AHM şi PTT.

c) Perfuziile cu sânge nu sunt totdeauna eficiente întrucât eritrocitele donatorului sunt, la rândul lor, distruse în vasele mici ce conţin trombi.

ANEMIA HEMOLITICĂ MECANICĂ LA CARDIACI

Delimitare, istoric, incidenţă. Evoluţia postoperatorie a unor pacienţi care au suferit intervenţii chirurgicale pe cord (în special implantări de proteze valvulare) poate fi complicată de apariţia unei anemii hemolitice mecanice (19, 30, 37).

Prezenţa eritrocitelor fragmentate în acest tip de anemie hemolitică a fost semnalată în 1961, la un pacient cu un defect septal atrial închis cu teflon (37). De atunci au apărut numeroase comunicări de cazuri cu hemoliză intravasculară la pacienţi cu diverse anomalii ale inimii şi vaselor mari, operaţi sau nu (19) (tabelul 34.III).

Incidenţa hemolizei mecanice este de 5—25% pentru protezări valvulare (în special aortice) şi de 5% pentru intervenţiile reparatorii utilizând materiale plastice (19). Utilizarea de metode sensibile (determinarea duratei de viaţă a eritrocitelor marcate cu ^{51}Cr, nivelul haptoglobinei, izoenzimele LDH, prezenţa hemosiderinuriei) demonstrează prezenţa unei hemolize intravasculare de mică intensitate la majoritatea pacienţilor cu proteze valvulare aortice.

Etiopatogenie. Hemoliza după chirurgie cardiacă este produsă de interacţiunea eritrocitelor normale cu un mediu înconjurător anormal.

TABELUL 34.III

Anomalii ale cordului şi vaselor mari asociate cu anemie hemolitică mecanică

A. *Fără intervenţii chirurgicale*
Stenoză aortică, ruptura sinusului Valsalva, ruptură de cordaje tendinoase, coarctaţie de aortă, anevrism aortic

B. *După intervenţii chirurgicale*
1) Petice de plastic:
reparare de *ostium primum,* repararea unui anevrism aortic cu *bypass* aortofemural
2) Înlocuire de valve:
proteze valvulare sintetice, xenografe, valvuloplastii (autografe), două sau mai multe valve înlocuite, valve cu minge, ruptura îmbrăcămintei valvei, regurgitaţii în jurul valvei

Fragmentarea eritrocitelor apare ca urmare a impactului direct pe suprafeţele anormale sau a fenomenului de turbulenţă şi a incompetenţei valvulare. Hemoliza cu ruperea membranei eritrocitare apare când se creează forţe de forfecare care depăşesc nivelul critic de 3 000 dyne/cm^2. Majoritatea cazurilor de hemoliză mecanică apar la pacienţii cu proteze aortice. Hemoliza apare mai frecvent la cardiacii protezaţi cu valve sintetice. Valvele biologice se asociază rar cu anemie hemolitică, cu excepţia celor care au devenit incompetente prin calcificări, rupturi sau perforări. Hemoliza este frecventă după repararea de defecte septale cu petice de plastic care nu se endotelizează.

Tablou clinic. Severitatea anemiei hemolitice după intervenţii pe cord este variabilă. Cei mai mulţi pacienţi prezintă un proces de hemoliză compensat; un număr mic au anemie severă care necesită repetate transfuzii cu sânge. Apariţia hemolizei coincide uneori cu o deteriorare severă a funcţiei cardiace legate de o rupere a unei porţiuni de valvă sau *de dezinserţia ei. Nu există semne clinice distincte cu excepţia celor* legate de boala de cord şi proteză. Dacă hemoliza este clinic semnificativă apare icterul.

Examene de laborator. Tabloul hematologic depinde de severitatea procesului hemolitic. Hb este scăzută în cazurile cu hemoliză intensă şi este normală la cei cu hemoliză compensată. Eritrocitele sunt normocrome şi normocitare. În hemolizele prelungite cu pierderi continue de fier în urină apare hipocromia. Reticulocitoza regenerativă duce la apariţia pe frotiu de macrocite policromatofile. Procentul eritrocitelor fragmentate reflectă direct severitatea hemolizei.

Măduva osoasă arată o hiperplazie a seriei eritrocitare; dacă hemoliza este de lungă durată, rezervele de fier ale măduvei osoase sunt scăzute ca urmare a hemosiderinuriei.

Alte consecinţe ale unei hemolize intravasculare intense sunt hemoglobinemia cu hemoglobinurie, scăderea haptoglobinei, prezenţa methemoglobinei, creşterea LDH. În cazurile cu hemoliză severă continuă apare hemosiderinurie.

Trombocitele sunt normale sau uşor scăzute. Gradul scăderii numărului de trombocite este proporţional cu suprafaţa de plastic expusă sân-

gelui. Trombocitele sunt consumate sau distruse ca urmare a expunerii la suprafețe neendotelizate ale protezei. Nivelul factorilor de coagulare este normal, iar *turnover*-ul fibrinogenului este normal (28).

Funcția renală este normală. La examenul post mortem al rinichiului se constată hemosideroza marcată (rinichi albastru).

Diagnostic. Prezența semnelor de hemoliză și a eritrocitelor fragmentate la un bolnav cardiac sau care a suferit o intervenție pe cord sugerează un proces de anemie hemolitică mecanică. Acest tip de hemoliză trebuie deosebit de un proces de anemie hemolitică autoimună care poate apărea postoperator. Testul Coombs pozitiv stabilește diagnosticul de anemie hemolitică autoimună.

Tratament. În situațiile în care anemia este moderată trebuie corectat deficitul de fier care limitează eritropoieza. În cazurile în care producția medulară de eritrocite nu poate compensa hemoliza sunt necesare transfuzii de masă eritrocitară. Dacă anemia este severă și nu poate fi compensată cu terapia medicală se recomandă înlocuirea protezei.

BIBLIOGRAFIE

1. ALPERT L. I., BENISCH B.: Am. J. Med. 1970; 48: 624.
2. AUTMAN K. H., SKARIN A. T., MAYER R. J.: Medicine 1979; 58: 377.
3. BRAIN M. C., DACIE J. V., HOURIHANE D. O. B.: Br. J. Haematol. 1962; 8: 358.
4. BRAIN M. C., HOURIHANE D. O. B.: Br. J. Haematol. 1967; 13: 135.
5. BRAIN M. C., ESTERLY J. R., BECK E. A.: Br. J. Haematol. 1967; 13: 868.
6. BRAIN M. C.: Ann. Rev. Med. 1970; 21: 133.
7. BUCOWSKI R. M.: Progress in Hemostasis and Thrombosis 1982; 6: 287, 337.
8. BULL B. S., RUBENGERG M. L., DACIE J. F., BRAIN M. C.: Br. J. Haematol. 1968; 14: 643.
9. CANTRELL J. E. și colab.: J. Clin. Oncol. 1985; 3: 723.
10. CANTRELL J. E., PHILLIPS T. M., SCHEIN P. S.: J. Clin. Oncol. 1985; 3: 723.
11. CAPELLI J. P., WESSON L. G. Jr., ERSLEV A. J.: Ann. Intern. Med. 1966; 64: 128.
12. COLIȚĂ A., BUTOIANU E., POPPA C. și colab.: Doc. Haemat. 1972; 2: 23.
13. COLIȚĂ A.: Contribuții la studiul anemiei hemolitice microangiopatice, Teză de doctorat, IMF București, 1974.
14. COLIȚĂ A., BUTOIANU E., URSEA C. și colab.: Third meeting Intern. Soc. Haemat., Londra, 1975. Abstr. 21: 50/III.
15. COLIȚĂ A., BUTOIANU E., NICOARĂ S. și colab.: Med. Int. 1984; 26: 77—85.
16. COLIȚĂ A., NICOARĂ S., BUTOIANU E. și colab.: Med. Int. 1988; 41: 71—81.
17. COLIȚĂ A., BUTOIANU E., NICOARĂ S. și colab.: Studiu retrospectiv al cazurilor de anemie hemolitică microangiopatică internate în Clinica de hematologie în perioada 1966—1992, A VII-a Conf. Nat. de Hematologie, București, oct. 1992.
18. DOLL D. C., RINGENBERG Q. S., YARBRO J. W.: J. Clin. Oncol. 1986; 4: 1405.
19. ERSLEV A. J.: Traumatic cardiac hemolytic anemia. În WILLIAMS W. J., BEUTLER C., ERSLEV A. J., LICHTMAN M. J. (eds.): Hematology, ed a IV-a, McGraw-Hill Inc., 1990, cap. 63, 654.
20. FALANGA A., GORDON S. G.: Biochemistry 1985; 24: 5558.
21. FLUTE P. T., RAKE M. C., WILLIAMS R. și colab.: Br. Med. J. 1969; 3: 20.
22. FOERSTER J.: Red cell fragmentation syndromes. În LEE G. R., BITHELL T. C., FOERSTER J., ATHENS J. W. (eds.): Wintrobe's Clinical Hematology, ed. a 9-a, Lea & Febiger, 1993, cap. 43, 1211.

23. GUINAN E. C., TARBELL N. J., NIEMEYER C. M. şi colab.: Blood 1988, 72: 451.
24. HARLAN J. M.: Clin. Hematol. 1984; 12: 39—68.
25. HOLLER E., KOLB H. J., MILLER E. şi colab.: Blood 1989; 73: 2018—2024.
26. KWAAN H. C.: Semin. Hematol. 1987; 24: 141.
27. LICHTMAN M. A., HOYER L. W., SEARS D. A.: Am. J. Med. Sci. 1968; 256: 239.
28. LOHRMANN H. P., ADAM W., HEYMER B. şi colab.: Ann. Intern. Med. 1973; 79: 368.
29. MARSH G. W., LEWIS S. M.: Semin. Haematol. 1969; 6: 133.
30. MARTINEZ J.: Microangiopathic hemolytic anemia. În Williams W. J., Beutler E., Erslev A. J., Lichtman M. J. (eds.): Hematology, ed. a 4-a, McGraw-Hill Inc., 1990, cap. 64, 657.
31. McBRIDE J. A.: Modern Treatment 1971; 2: 419.
32. MURGO A. J.: Semin. Hematol. 1987; 24: 161.
33. PRITCHARD J. A., BREKKEN A. L.: Am. J. Obstet. Gynecol. 1967; 97: 681.
34. PROPP R. P., SCHARFMAN W. B.: Blood 1966; 28: 623.
35. RUBENBERG M. L., REGOECZI E., BULL B. S. şi colab.: Br. J. Haematol. 1968; 14: 627.
36. SAYED H. M., DACIE J. V., HANDLEY O. D.: Thorax 1961; 16: 356.
37. SPRUCE W. E., FORMAN S. J., BLUME K. G. şi colab.: Acta Hematol. 1982; 67: 206.
38. VASSALLI P., MORRIS R. H., McCLUSKEY R. T.: J. Exp. Med. 1963; 119: 467.
39. VENKATACHALAM M. A., JONES D. B., NELSON D. A.: Blood 1968; 32: 278.
40. WEINER C. P.: Semin. Hematol. 1987; 24: 119.
41. * * * Case Records of Massachusetts General Hospital — Case 16—1988. New Engl. J. Med. 1988; 318: 1047.

XXXV

ANEMIILE HEMOLITICE PRIN MECANISME IMUNE

DAN COLIȚĂ, ILEANA DIMA

Introducere. Anemiile hemolitice prin mecanisme imune sunt induse de două categorii de mediatori: anticorpi (Atc) specifici pentru antigene eritrocitare (allo-Atc și auto-Atc) și Atc specifici pentru medicamente.

Eritrocitele exprimă diverse antigene (Atg), determinate genetic și grupate în sisteme. În vorbirea curentă aceste Atg sunt denumite „Atg de grup sanguin". Atg unui sistem sunt inegal repartizate între indivizii umani, în sensul că pot fi exprimate pe eritrocitele unor persoane și pot lipsi la altele (sunt allo-Atg). Un individ normal își tolerează propriile Atg eritrocitare, ca și eritrocitele altei persoane care sunt prevăzute cu o panoplie identică de allo-Atg, dar va riposta prin elaborarea de allo-Atc dacă în circulația sa vor pătrunde eritrocite „incompatibile" — echipate cu allo-Atg care sunt diferite de cele ale propriilor globule roșii. Primul contact cu un allo-Atg nu are consecințe clinice. Dacă fenomenul se repetă și allo-Atg care au produs „sensibilizarea" inițială pătrunde din nou în circulația receptorului, reacția imună a acestuia va fi promptă și energică: eritrocitele necompatibile vor fi hemolizate selectiv cu contribuția allo-Atc produși în titru mare. În practică hemolizele mediate de allo-Atc apar după transfuzii incompatibile sau după sarcini incompatibile.

Dacă formarea allo-Atc este rezultatul unui răspuns imun normal față de Atg străine, apariția auto-Atc exprimă de regulă o stare de boală. Producerea de auto-Atc încalcă legea generală de tolerare a Atg proprii (*„horror autotoxicus"*) deoarece țintele lor sunt Atg eritrocitare autologe. Auto-Atc produc atât hemoliza eritrocitelor proprii, cât și hemoliza eritrocitelor izocompatibile administrate terapeutic, ceea ce scade randamentul antianemic al transfuziilor și, uneori, îngreuiază alegerea probelor de sânge ce urmează a fi transfuzate.

Cu excepţia câtorva cazuri izolate, medicamentele se comportă ca haptene: ele devin imunogenice numai după ce s-au combinat cu macromolecule ale gazdei, care joacă rol de cărăuşi. Moleculele purtătoare pot fi proteine structurale ale membranei eritrocitare sau proteine plasmatice solubile. Conjugatele imune (combinaţiile haptenă+cărăuş) induc formarea de Atc anti-haptenă. Atc se ataşează specific pe haptenă, formând complexe imune, fie direct pe eritrocite, fie în plasmă. Complexele circulante solubile sunt adsorbite pe suprafaţa eritrocitelor, pe măsură ce se formează. În consecinţă, în ambele mecanisme Atc ajung pe suprafaţa eritrocitelor. Reacţia generală a organismului este îndepărtarea complexelor imune, dar din cauza legăturilor create cu eritrocitele purtătoare se ajunge şi la eliminarea acestora.

Indiferent de procesele patogenice care au generat apariţia anticorpilor antieritrocitari, mecanismele hemolizei sunt aceleaşi. Ele depind de clasa anticorpilor (IgG sau IgM), ca şi de capacitatea lor de interacţiune cu macrofagele şi de activare a complementului. Aceste proprietăţi ale Atc determină sediul hemolizei: extravascular sau intravascular (vezi cap. XXVI, p. 702—711).

PARTENERII REACŢIEI IMUNE

Antigenele eritrocitare. Pe suprafaţa eritrocitelor sunt exprimate peste 100 de Atg grupate în sisteme „de grup sanguin". Dintre acestea cele care au o implicare majoră în hemolizele imune sunt: Atg, AB0, Rhesus (Rh), Ii, P, Kell (K), Kidd (Jk) şi Duffy (Fy). *Atg A şi B* sunt incomplet dezvoltate la naştere. Acest fapt explică următoarele două aspecte întâlnite la nou-născuţi: 1) întâmpinarea unor dificultăţi în determinarea grupului sanguin şi 2) intensitatea mai redusă a hemolizei generate în incompatibilitatea feto-maternă AB0. Expresia maximă a acestor Atg se realizează între 6 luni şi 3 ani (tabelul 35.I). Există două variante antigenice ale Atg A (A_1 şi A_2). În terminologia curentă se admite că persoanele de „grup A" exprimă pe eritrocite una din aceste variante, persoanele de „grup B" exprimă numai Atg B, persoanele de „grup AB" exprimă ambele Atg, în timp ce persoanele de „grup 0" nu exprimă nici unul din aceste 2 Atg. În realitate, pe suprafaţa eritro-

TABELUL 35.I

Densitatea situsurilor antigenice A şi B pe suprafaţa eritrocitelor în funcţie de vârstă (după 31)

Vârsta / Situsuri	Nou-născut	Adult
Situsurile A: A_1	250 000—370 000	810 000—1 170 000
A_2	140 000	240 000— 290 000
A_1B	220 000	460 000— 850 000
A_2B	—	120 000
Situsurile B: B	—	610 000— 830 000
A_1B	—	310 000— 560 000

celor de grup 0 există o substanță antigenică strâns intricată cu Atg A și B, denumită „substanța H". Aceasta face ca persoanele de „grup 0" să prezinte în realitate fenotipul A—, B—, H+. Substanța H joacă rol de „trunchi" la care, la comanda genelor specifice A sau/și B, se adaugă determinanții care definesc specificitățile A sau/și B. Substanța H este exprimată la aproape toți indivizii. Rarele persoane H-negative sunt în aparență tot de grup 0, dar în realitate prezintă un fenotip eritrocitar particular denumit „fenotipul Bombay" (A—, B—, H—).

Atg A, B și H nu se exprimă numai pe eritrocite, ci și pe alte celule (trombocite, leucocite, celulele endoteliale care mărginesc vasele, celulele epidermice și epiteliale și spermatozoizi). În plus Atg A, B, H sunt nespecifice: ele există la om, animale, unele plante și unele bacterii.

Antigenele sistemului Rh. Astăzi sunt recunoscute peste 39 de antigene ale sistemului Rhesus. Dintre acestea, 5 Atg sunt mai importante, identificate prin literele: D, C, E, c, e. Atg d nu a fost pus în evidență niciodată. Frecvența acestor Atg este următoarea: ~85% din indivizii de rasă albă posedă pe Er Atg D, ~70% posedă Atg C, 30% posedă Atg E, 80% posedă Atg c, iar ~97% din indivizi posedă pe Er lor Atg e. Atg Er care se găsesc la majoritatea indivizilor sunt numite Atg publice, de mare frecvență, monomorfice, iar Atg care se găsesc la un număr restrâns de indivizi se numesc Atg particulare (private), de mică frecvență sau exclusiv la o rasă; exemplu: Atg Diego la rasa galbenă. Spre deosebire de Atg A și B, Atg Rh sunt prezente numai pe Er. Acest fapt explică lipsa de protecție față de Atc sistemului Rh în boala hemolitică a nou-născutului (BHNN) prin alloimunizare la Atg D spre deosebire de BHNN prin incompatibilitate AB0, unde hemoliza este moderată datorită faptului că Atc sunt neutralizați prin Atg A și B ale celulelor endoteliale vasculare și tisulare fetale. Atg D antrenează un răspuns imun de 50 de ori mai frecvent decât Atg c și E. Dacă este transfuzată o unitate de sânge D pozitiv la un individ Rh-negativ, sunt produși Atc anti-D în 60—80% din cazuri, în timp ce Atc anti-c și anti-e nu apar decât în 2% din cazuri de transfuzii incompatibile. De aceea numai Atg D este studiat în rutină și în funcție de prezența sa donatorul este considerat Rh + sau —. Atg D se dezvoltă din luna a doua a vieții intrauterine și este responsabil în peste 90% din cazuri de BHNN (celelalte Atg Rh sunt mai rar în cauză). Densitatea situsurilor antigenice D este redusă (~10 000 față de 1 milion de situsuri A), ceea ce face ca Atc cu specificitate față de aceste Atg să fie „neaglutinanți" și în general nefixatori de complement. Atg D prezintă varianta D^w (cu imunogenicitate slabă). El nu poate fi detectat decât prin tehnici sensibile. Importanța sa clinică nu este neglijabilă pentru că el poate imuniza indivizii „Rh—".

Antigenele I, i. Atg I este un Atg public, el este absent la un adult din 5 000 (27). Pe Er fătului și nou-născutului este exprimat Atg i, care are particularitatea de a dispărea progresiv în următoarele 12—18 luni care urmează nașterii (48). Paralel cu diminuarea Atg i pe Er se observă apariția progresivă a Atg I care atinge dezvoltarea completă aproape de 2 ani. De aceea multă vreme Atg i a fost considerat ca substratul Atg I. Date recente însă arată că situsurile Atg i nu mai sunt

accesibile la suprafața Er ca urmare a dezvoltării specificității I (31). Atg I prezintă structură în mozaic, având diferite specificități: I^D (pe Er adultului), I^F (pe Er de nou-născut, I^T [pe Er în tranziție (i—I)], I^S (Atg prezente în secreții). Atg I, i sunt prezente în afara Er pe: limfocite, în salivă, în lipte, în lichidul de chist ovarian, hidatic, în lichidul amniotic, urină. Diminuarea Atg I Er cu creșterea Atg i a fost observată în: leucemii, statusuri preleucemice, sindroame mieloproliferative, aplazii medulare, hemoglobinurie paroxistică nocturnă, anemie hemolitică cronică. Atg I, i constituie specificitatea autoanticorpilor anti-Er din anemia hemolitică autoimună cu aglutinine reci.

Antigenul $P^{(TJa)}$ este un Atg de mare frecvență, exprimat pe Er, limfocitele B și T și fibroblaștii pielii. Se constată o frecvență ridicată de avorturi la femeile de fenotip $p^{(TJa-)}$. Acest fenomen, încă neexplicat, pare să fie cauzat de Atc anti-P-P_1P^K. Dacă această ipoteză va fi confirmată, Atc anti-P-P_1P^K va fi un exemplu unic de Atc natural responsabil de avort (31). În hemoglobinuria paroxistică *a frigore*, hemolizinele bifazice au specificitate față de Atg P.

Anticorpii. Atc care mediază hemoliza imună sunt Atc naturali și Atc imuni, cu specificitate față de Atg eritrocitare. Apelativul „natural" caracterizează sistemul Atc care apare în plasma indivizilor normali, la scurt timp după naștere (0—6 luni) aparent spontan (în afara unei imunizări demonstrabile). Mecanismul care induce formarea Atc naturali nu este integral descifrat. Atc naturali sunt produși la contactul precoce al organismului — pe cale respiratorie, digestivă sau prin contaminarea bacteriană — cu substanțele larg răspândite în natură și a căror compoziție chimică este identică sau înrudită cu aceea a Atg Er. Atc naturali care apar constant (regular) în plasma indivizilor normali corespunzător Atg absente pe Er sunt numiți Atc naturali regulari. Aceștia sunt:

— Atc anti-A (α) ai indivizilor de grup sanguin B;

— Atc anti-B (β) ai indivizilor de grup sanguin A;

— Atc. anti-A și anti-B ai indivizilor de grup sanguin 0.

Nu există Atc naturali anti-Rh.

La aceștia se adaugă Atc naturali care apar inconstant, numiți Atc naturali iregulari (tabelul 35.II). Aceștia reprezintă uneori un pericol în transfuzii. Atc naturali sunt de clasă IgM, nu traversează placenta și sunt aglutinanți sau hemolizanți. Ei pot cauza reacții hemolitice posttransfuzional prin incompatibilitate eritrocitară. Deși puțin frecvente, ele sunt în același timp și cele mai grave. Dificultatea transfuzională rezultă din faptul că pe lângă împiedicarea distrugerii Er transfuzate de către Atc primitorului, trebuie evitată sensibilizarea primitorului prin introducerea unui Atg străin.

Anticorpii imuni, spre deosebire de Atc naturali, apar ca urmare a unei stimulări antigenice cunoscute. Ei apar inconstant și tranzitoriu după câteva săptămâni până la 20 de luni după imunizare. Ei rezultă din: heteroimunizare, alloimunizare, pot fi induși de medicamente și ca urmare a dezechilibrului în recunoașterea propriilor Atg (autoanticorpii).

Heteroimunizarea se dezvoltă în urma vaccinării pentru profilaxia difteriei, tetanosului, febrei tifoide, gripei (prepararea vaccinurilor ne-

TABELUL 35.II

Fenotipuri curente ale sistemului AB0

Fenotip	Antigene eritrocitare	Anticorpi serici naturali	
		Regulari (constant)	Iregulari (inconstant)
A_1	A_1	Anti-B	Anti-H (foarte rar)
A_2	A	Anti-B	Anti-A_1 (1—2%)
B	B	Anti-A	—
A_1B	A_1 şi B	—	Anti-H (foarte rar)
A_2B	A şi B	—	Anti-A_1 (25%)
0	Nici A, nici B	Anti-A şi anti-B	—

cesită preparate animale: porc, cal, embrion de pui, bogate în substanţă A) (4, 31).

Alloimunizarea. Apariţia alloanticorpilor poate fi provocată prin:

- sarcină incompatibilă;
- transfuzie de Er incompatibile;
- transfuzie de plasmă umană, de derivaţi sanguini (trombocite, leucocite). În acest caz stimularea provine de la Er reziduale.

Mai multe sute de alloanticorpi au fost identificaţi. Ei au specificitate faţă de Atg Er. Alloanticorpii cel mai frecvent în cauză sunt Atc cu specificitate faţă de Atg din sistemele:

— AB0 (anti-A şi anti-B imuni);
— Rhesus (anti-D, anti-E, anti-c, anti-C, anti-e);
— Kell (anti-K);
— Kidd (anti-JK^a);
— Duffy (anti-Fy^a);
— M, N, S, s ... etc.

Evoluţia concentraţiei alloanticorpilor în cursul timpului a fost studiată prospectiv de Ramsey şi Larson. Aceşti autori au arătat că ~30% din alloanticorpi nu mai sunt decelabili după 1—60 de luni de la apariţia lor. Procentajul este şi mai ridicat (60%) în cazul alloanticorpilor anti-JK^a, explicând implicarea lor atât de frecventă în hemoliza posttransfuzională întârziată de origine imunologică (61).

Alloanticorpii sunt de clasă IgG (spre deosebire de Atc naturali), traversează placenta şi au caracter neaglutinant (incomplet). Aglutinarea cu Atc IgG „incompleţi" poate fi totuşi obţinută prin adăugarea de albumină bovină, tratament enzimatic al Er (diminuarea încărcării negative a Er uşurează aglutinarea lor) sau, mai ales, recurgând la testul Coombs, cu un reactiv anti-IgG.

Atc anti-medicamente şi autoanticorpii sunt trataţi la anemia hemolitică indusă de medicamente şi respectiv anemia hemolitică autoimună.

MECANISMELE HEMOLIZEI IMUNE

Comportă două etape:

1) prima etapă constă în sensibilizarea Er de către Atc cu specificitate pentru Atg corespunzătoare (ataşarea Atc pe Atg);

2) etapa a doua constă în distrugerea Er de către elemente efectoare: fagocite (macrofage splenice, celule Kupffer, monocite circulante, granulocite neutrofile), limfocite (prin mecanismul denumit ADCC = *antibody-dependent cellular cytotoxicity)* şi, mai rar, molecule („complexul de atac al membranei", care se asamblează prin activarea cascadei complementului prin calea clasică).

Mecanismele hemolizei imune variază în funcţie de mai mulţi factori:

- anticorpii în cauză: concentraţie, optim termic, capacitatea de a fixa complementul;
- antigenele în cauză: număr de situsuri la suprafaţa eritrocitului;
- prezenţa sau nu în organism de substanţe solubile de grup capabile să neutralizeze anticorpii corespunzători (efect protector mai ales împotriva anticorpilor anti-Lewis); factor ce intervine în transfuzia de sânge;

— diferenţe individuale, mai puţin explicate, care determină variaţia reacţiilor observate (absenţa reacţiilor la unii indivizi şi reacţii intense la alţii) în prezenţa aceluiaşi complex antigen-anticorp (31).

După locul de distrugere maximă a Er se cunosc două tipuri de hemoliză:

— intravasculară — mediată de sistemul complement şi

— extravasculară (intratisulară) — mediată de sistemul macrofagic.

- **Hemoliza intravasculară** (HIV) este un fenomen rar întâlnit. Efectorul acestui tip de hemoliză este complementul. Acesta produce liza eritrocitelor direct în vasele sanguine cu eliberarea consecutivă de hemoglobină în plasmă. Activarea complementului este mediată de anumite familii de anticorpi (hemolizinele). Aceştia sunt capabili să reproducă mecanismul şi *in vitro,* ceea ce permite identificarea lor în laborator. Atc cu acţiune hemolizantă pot fi specii de IgM sau (mai rar) de IgG. După modul de apariţie ei pot fi Atc naturali, allo-Atc sau auto-Atc. După specificitate pot fi anti-A, anti-B, anti-H (Bombay), anti-P, anti-PP_1P^k (Tja), anti-Vel, anti-Lewis şi anti-J^{ka} (pentru Atc naturali şi allo-Atc), anti-P (pentru auto-Atc „bifazici") şi foarte rar şi anti-I (pentru unii auto-Atc de clasă IgM activi la rece). Ataşarea moleculelor de Atc pe eritrocite determină formarea tot atâtor complexe de atac ale membranei celulei-ţintă, care la rândul lor provoacă multiple perforaţii în membrană. Prin aceste soluţii de continuitate pătrund în celulă apă şi Na^+ şi se scurg în afară K^+ şi hemoglobină. Una din condiţiile prezumate care facilitează desfăşurarea tuturor etapelor activării complementului este prezenţa în număr mare a fracţiunilor acestuia pe

eritrocit. Astfel s-a estimat că sunt necesare ~60 000 de molecule de C_3 și 25 000 de molecule de C_5 pentru a se forma 25 000 de molecule de C_5-C_9 (48).

Principala cauză de hemoliză imună intravasculară în patologia umană este cea provocată de transfuzarea de eritrocite incompatibile, care deși este puțin frecventă este și cea mai gravă.

• **Hemoliza extravasculară.** În acest tip de hemoliză distrugerea eritrocitelor nu mai are loc în circulația sistemică, ci în organele predilecte, prin intermediul fagocitelor macrofage existente în acestea. Macrofagele „recunosc" și reține eritrocitele în trecere pe care sunt fixate molecule de anticorpi (IgG), de complement (fracțiunea C_{3b}) sau ambele. Atașarea eritrocitelor „sensibilizate" pe macrofage este urmată de înglobarea și digerarea lor intracelulară.

Hemoliza extravasculară mediată de IgG. Anticorpii IgG se leagă pe Atg eritrocitare prin segmentul Fab. Drept urmare extremitățile Fc ale moleculelor de IgG rămân libere și pot fi atașate pe receptorii Fcγ exprimați pe fagocite (aderență opsonică) (fig. XXXV.1.). Celulele care exprimă astfel de receptori sunt granulocitele neutrofile și macrocitele din circulație și macrofagele din unele țesuturi și organe. *In vivo* acest

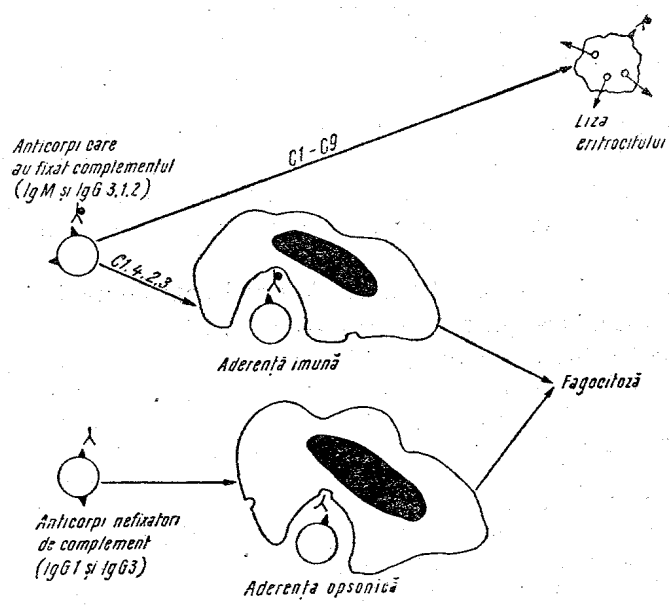


Fig. XXXV.1. — Mecanismele distrugerii eritrocitelor în AHAI.

mecanism de hemoliză imună are loc cu mare predominanță în splină în care sunt întrunite 4 condiții optime pentru eritrofagocitoză: încetinirea fluxului circulator, hemoconcentrație enormă, scăderea pH-ului local și o aglomerație mare de macrofage rezidente. Aderența eritrocitelor este condiționată de subclasa de IgG din care fac parte anticorpii, deoarece macrofagele posedă receptori numai pentru moleculele de

IgG_1 și IgG_3. Așa se face că în cazul elaborării unor auto-Atc de clasă IgG_2 sau IgG_4 nu se produce hemoliză.

Importanța mecanismului de imunoaderență în potențarea fagocitozei mediate de macrofagele splenice este subliniată de următoarele observații: 1) *in vitro* eritrocitele învelite cu IgG se atașează pe macrofage sau pe monocite formând imagini de rozete (2); 2) injectarea unui eșantion de eritrocite autologe pe care s-au fixat în prealabil fragmente $F(ab)_2$ de IgG nu este urmată de eliminarea lor mai rapidă din circulație; în schimb, repetarea experimentului cu eritrocite autologe învelite cu molecule întregi de IgG conduce la sustragerea lor rapidă din circulație; 3) dacă în plasma bolnavului există Atc liberi (din subclasele IgG_1 și IgG_3) aceștia se atașează și „ocupă" receptorii macrofagelor împiedicând astfel accesul eritrocitelor sensibilizate la acești receptori (acest mecanism este exploatat în terapeutică prin injectarea i.v. de Ig).

Nu toate eritrocitele care aderă la macrofage sunt fagocitate. Din cele câteva zeci de eritrocite care se atașează concomitent pe suprafața unui macrofag vor fi fagocitate, într-o unitate de timp, numai 3—5 globule roșii. Această capacitate restrânsă de înglobare a eritrocitelor de către o singură celulă macrofagă este dictată de limitele fizice ale procesului de fagocitoză. După atașarea unui eritrocit macrofagul emite un număr de procese membranare care îl învelesc progresiv, până ce, în final, îl încorporează. Prin aceasta macrofagul suferă o depleție membranară a cărei suprafață este egală cu aceea a eritrocitului încorporat, iar prin înglobarea concomitentă a mai multor eritrocite se ajunge la o „insuficiență de membrană". Din acest motiv majoritatea eritrocitelor atașate nu pot fi fagocitate și ajung să se desprindă de pe macrofag. Unele dintre ele, care rămân aparent indemne, vor păstra o durată normală de supraviețuire. Altele pot suferi o fagocitoză parțială cu pierderea doar a unui număr limitat de molecule din membrană. Ele se detașează ca microsferocite rigidizate, care vor fi reținute în splină la noua trecere prin cordoanele pulpei roșii. Pentru refacerea membranei consumate și redobândirea capacității de fagocitoză, macrofagul are nevoie de mai multe ore (28).

Hemoliza extravasculară mediată de IgG se produce de regulă în situația în care acestea au specificitate anti-Rh. Această condiție este întâlnită în clinică în incompatibilitatea anti-Rh (posttransfuzie sau postsarcină) și în anemiile hemolitice autoimune cu Atc la cald.

Hemoliza extravasculară mediată de C_{3b}. Atc capabili să fixeze complementul pe eritrocite sunt IgM și unele subclase de IgG ($G_3 > G_1$). Dintre aceștia, Atc IgM sunt constant fixatori de complement, datorită structurii lor de stea cu 5 brațe, între care se pot insera molecule de C_{1q}. In schimb, fixarea lui C_{1q} la IgG necesită existență a 2 molecule de anticorpi atașate pe eritrocit la o distanță mai mică sau egală cu dimensiunea acestui component al sistemului complement. Această condiție de apropiere poate fi îndeplinită numai atunci când Atc sau IgG au specificitate față de Atg expuse cu densitate foarte mare pe eritrocite. În practica medicală eceste specii de Atc sunt rar observate. Cel mai frecvent hemoliza extravasculară mediată de complement însoțește imunizarea cu Atc de clasă IgM.

Atc IgM sunt macroglobuline, aglutinează *in vitro* și *in vivo* eritrocitele și au aviditate maximă de cuplare cu Atg specifice la temperatură scăzută (sunt „aglutinine la rece"). Câtă vreme rămân fixați pe eritrocite, Atc IgM captează molecula de C_{1q} din plasmă. Ajunse în acest mod pe eritrocite moleculele de C_{1q} se activează și inițiază cascada reacțiilor căii clasice. Dinamica evenimentelor descrise este termodependentă: cu cât crește temperatura ambiantă, afinitatea IgM pentru Atg scade, iar viteza reacțiilor intermediare ale activării complementului crește. Soarta eritrocitului este dependentă de sistemul complement, deoarece activările în lanț ale acestuia se desfășoară pe membrana eritrocitară. Etapa cheie pentru hemoliză este atașarea componentului C_3 pe eritrocit. Acesta este scindat enzimatic de „convertaza C4b2a" în fragmentele C_{3a} (care trec în plasmă) și C_{3b} (care rămân pe eritrocit). Activarea lui C_3 este independentă de prezența IgM pe eritrocitul-țintă. Atc se desprinde de pe eritrocit la o anumită temperatură, care este denumită convențional „amplitudine termică". În plasma indivizilor normali se găsesc frecvent titruri mici de aglutinine la rece ($\leqslant 1/16$) cu amplitudine termică foarte scăzută, mult sub temperatura mediului intern. Prin urmare la subiecții normali nu sunt întâlnite condițiile necesare pentru fixarea Atc și activarea complementului pe eritrocite. În schimb, autoaglutininele patologice au frecvent amplitudine termică ridicată ($>25°C$) ceea ce permite *in vivo* atașarea complementului (proces pentru care temperatura optimă este de 20—25°C) și o convietuire pe eritrocit a anticorpilor și a complementului suficient de lungă pentru a se ajunge la activarea lui C_3.

Formarea compusului C_{3b} joacă soarta eritrocitului. Teoretic acesta se poate complexa cu convertaza căii clasice pentru a forma un compus enzimatic trimolecular, C4b2a3b, care activează componentul C_5, deschizând astfel calea formării unității finale de citoliză („complexul de atac al membranei"). În realitate formarea enzimei de clivare a lui C_5 este extrem de limitată: numai moleculele de C_{3b} plasate în proximitatea convertazei C_3 și totodată dispuse pe membrana eritrocitului într-o orientare moleculară convenabilă, sunt apte să se integreze în complexul C4b2a. De aceea în imensa majoritate a cazurilor evenimentul se limitează la formarea compusutlui C_{3b}, ale cărui molecule acoperă eritrocitele. Înlăturarea pericolului potențial al prezenței moleculelor de C_{3b} pe suprafața eritrocitară este îndeplinită de un inactivator specific existent în plasmă: C_{3b}-INA. Sub acțiunea C_{3b}-INA are loc scindarea moleculelor de C_{3b} în 2 fragmente hemolitic inactive: C_{3c} (care trece în plasmă) și C_{3d} (care rămâne atașat stabil pe situsurile eritrocitare).

C_{3b} este un factor de opsonizare: este recunoscut de celule ale sistemului macrofagic care exprimă receptori specifici și prin aceasta mediază imunoaderența eritrocitelor-țintă la aceste fagocite. În organismul uman celulele dotate cu RC_{3b} sunt celulele Kupffer. Un experiment ilustrativ pentru rolul determinant al lui C_3 a fost realizat la iepuri la care s-au injectat aglutinine umane (IgM anti-I). Acestea pot reproduce secvențele descrise mai sus deoarece eritrocitele iepurelui exprimă Atg I. S-a lucrat cu 3 loturi de animale: normale, cu deficit de C_3 și cu deficit de C_6. La animalele normale injecția a provocat hemoliză prin ambele mecanisme (extra- și intravascular); la animalele cu deficiență de C_6 hemoliza a fost

numai extravasculară, iar la animalele cu deficiență de C_3 nu s-a produs hemoliza (Brown și colab., citat de 61).

Mediind activarea complementului, Atc IgM pot provoca hemoliză prin ambele mecanisme fiziopatologice. Hemoliza intravasculară survine însă doar ca un accident rar și, de cele mai multe ori, pasager, în timp ce mecanismul principal de liză este cel extravascular (intrahepatic). Intensitatea hemolizei este mult diminuată de acțiunea continuă a C_{3b}-INA, care scurtează durata de viață a moleculelor de C_{3b} pe suprafața eritrocitelor și, prin aceasta, exercită un dublu efect protector: blochează o eventuală evoluție catastrofală către activarea lui C_5 și reduce intensitatea fagocitozei intrahepatice întrucât celulele Kupffer nu posedă receptori pentru C_{3d}. Transformarea continuă a lui C_{3b} face ca o parte din eritrocitele care au aderat la celulele Kupffer să se poată desprinde și să se reîntoarcă în circulație. Eritrocitele înveșmântate în C_{3d} au durată de viață normală, deoarece C_{3d} nu este recunoscut de nici o specie de fagocite umane și blochează permanent receptorii eritrocitari, împiedicând atașarea de noi molecule de C_3. Ansamblul acestor fenomene explică de ce sensibilizarea eritrocitelor prin complement este urmată de o rezistență relativă la hemoliză.

Evidențierea Atc fixați pe eritrocite. Noțiunea de Atc aglutinant și neaglutinant depinde de: 1) structura moleculară a Atc (IgM sau IgG) și deci de valența sa; 2) de densitatea receptorilor Atg la suprafața Er; 3) de mediul în care se produce reacția (forța ionică).

Ca regulă generală, Atc aglutinanți sunt IgM, iar Atc neaglutinanți sunt IgG. Atc aglutinanți sunt Atc care aglutinează Er în ser fiziologic. Atc neaglutinanți pot fi detectați prin tehnici de aglutinare artificială: testul Coombs, tratare enzimatică a Er, adăugare de soluții macromoleculare.

Coombs a pus la punct o metodă ingenioasă pentru detectarea Atc neaglutinanți. El a realizat o aglutinare artificială printr-un procedeu imunologic.

Testul Coombs are la bază antigenicitatea moleculelor de Ig care, fixate pe eritrocite prin fragmentul Fab, expun situsurile antigenice ale fragmentului lor Fc. Adăugarea de reactiv antiglobulină umană la eritrocitele acoperite cu Atc neaglutinanți permite declanșarea aglutinării eritrocitelor (fig. XXXV.2). Rectivul antiglobulină umană este obținut prin imunizarea animalelor (de obicei iepuri și capre). După fracțiunea plasmatică injectată se obține un reactiv antiglobulinic polispecific care conține la un loc Atc anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM și anti-C_3 sau reactiv antiglobulinic monospecific: anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA, anti-C_3 (anti-C_{3b} și C_{3d}) și anti-C_4.

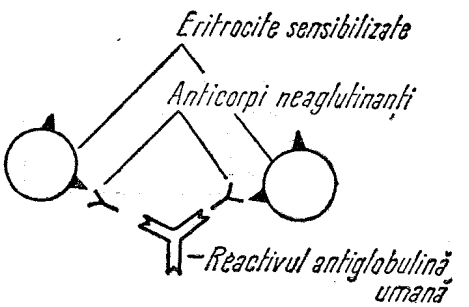


Fig. XXXV.2. — Acțiunea reactivului antiglobulină umană.

Testul Coombs este utilizat în 2 versiuni: testul Coombs direct (TCD) și testul Coombs indirect (TC ind).

Testul Coombs direct sau testul antiglobulină umană. Ca principiu, TCD evidențiază prezența Ig și/sau fracțiuni ale complementului (Er „sensibilizate") fixate *in vivo* la suprafața Er (debarasate prin spălare de proteinele plasmatice) cu ajutorul reactivului antiglobulină umană care servește de legătură între Atc fixați specific, provocând aglutinarea Er (fig. XXXV.2) (4).

În fața unui TCD pozitiv cu reactiv polispecific, este necesară precizarea naturii proteinei responsabile de sensibilizarea Er. Pentru aceasta se recurge la TCD folosind antiseruri monospecifice: anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-C_3, anti-C_4.

Negativitatea TCD nu semnifică în mod obligatoriu absența anticorpilor (27). Pentru a obține o aglutinare vizibilă cu ochiul liber, densitatea Ig trebuie să fie mai mare de 200 de molecule pe Er (4). Utilizând tehnici mai sensibile se poate demonstra sensibilizarea Er cu 50—100 molecule Ig/Er. Deși concentrația AAC este scăzută, ei sunt suficient de toxici pentru a provoca distrugerea prematură a Er.

După efectuarea TCD, trei tipuri principale de pozitivitate sunt observate:

1) „IgG" — când Er sunt învelite numai cu IgG (așa-numitul TCD tip „gama");

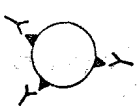
Eritrocite testate	*Anti Ig-G*	*Anti C3*	*Test Coombs direct*
	—	—	*Negativ*
	+	—	*Pozitiv Ig-G*
	—	+	*Pozitiv C3*
	+	+	*Pozitiv mixt Ig G + C3*

Fig. XXXV.3. — Cele trei tipuri de AHAI definite prin natura globulinei (IgG și/sau complement) prezente la suprafața eritrocitelor.

2) „IgG+C_3" — când Er sunt învelite cu IgG+C_3 în același timp;

3) „C_3" (așa-numitul TCD „non-gama") când Er sunt învelite numai cu C_3 (fig. XXXV.3) (4).

TCD relevă foarte rar IgA sau IgM. Auto-Atc IgM sunt detectați mai greu la suprafața Er prin TCD pentru că sunt detașați mai ușor prin spă-

lare de pe Er. Dar IgM fixează totdeauna C_3 la suprafața Er (fiecare moleculă fixează mai mult de 100 de molecule C_3), de aceea depistarea prin TCD este mai ușor realizabilă prin intermediul potențialului anti-C_3 al antiglobulinei.

Măsurarea cantitativă a IgG fixat la suprafața Er a arătat că nu există totdeauna o corelație între numărul moleculelor IgG și severitatea hemolizei. Recunoașterea subclasei IgG în cauză utilizând antiseruri specifice are o mare importanță. S-a constatat că AAC responsabili de hemoliză sunt IgG_1 și IgG_3, foarte rar IgG_2. Pacientul ale cărui Er sunt acoperite cu IgG_4 nu prezintă semne de hemoliză.

Semnificația diagnostică a TCD. TCD este o reacție cheie în imunohematologie. El are valoare diagnostică, prognostică și în urmărirea evoluției bolnavului și a eficacității tratamentului.

• TCD definește AHAI în majoritatea cazurilor, fiind pozitiv în prezența autoanticorpilor și/sau complementului fixați la suprafața eritrocitelor.

• Aderența imunoglobulinelor poate să releve un alloanticorp, un anticorp antimedicament.

• TCD mai poate fi pozitiv prin fixarea lui C_3 din complexele imune circulante la receptorii C_{3b} ai eritrocitelor.

Astfel TCD efectuat cu un reactiv antiglobulină umană polispecific poate fi pozitiv în următoarele situații:

— anemie hemolitică autoimună cu anticorpi la cald (fiind cuprinse și AHAI de origine medicamentoasă: α-metil-dopa, L-dopa, ac. mefenamic) unde TCD este tip IgG și/sau C_{3d}, C_4;

— anemie hemolitică autoimună cu anticorpi la rece, unde TCD este de tip C_{3d} și/sau C_4;

— transfuzie de sânge incompatibil cu TCD tip IgG și/sau C_{3d}, C_4;

— sensibilizarea Er prin medicamente; exemplu: penicilina poate da un TCD tip IgG, rifampicina poate da un TCD tip C_3;

— boala hemolitică a nou-născutului cu TCD tip IgG (rar C_{3d} și/sau C_4);

— diferite boli ca: hepatita infecțioasă, pneumonia virală, mononucleoza infecțioasă, anemia megaloblastică, reticulocitoza marcată, favismul, lupusul eritematos sistemic, porfiria acută intermitentă, neoplazii, bolnavi supuși intervențiilor chirurgicale pe cord deschis (~33%), bolnavi supuși unei dialize renale prelungite (~3%);

— sensibilizarea *in vitro* a Er cu complement;

— fără să se cunoască cauza, o persoană din 3 000—10 000 de persoane dintr-o populație sănătoasă prezintă TCD pozitiv;

— TCD mai are aplicații în tipajul eritrocitar (exemplu: D^a, K, Fy^a).

Trebuie subliniat că pozitivitatea TCD constituie un element major în diagnosticul AHAI, dar el singur nu semnifică totdeauna existența AAC antieritrocitari și cu atât mai puțin AHAI. TCD trebuie interpretat în contextul imunohematologic în strânsă colaborare clinică-laborator. Invers, negativitatea acestui test nu semnifică obligatoriu absența autoanticorpilor, întrucât s-a semnalat existența unor *AH autoimune cu serologie negativă*. Este vorba de situații clinice rare, cu extreme 1—10% după

diverşi autori, dar care pun problema de diagnostic. Prezumţia naturii autoimune a hemolizei se fondează pe argumente indirecte:

— absenţa altor cauze etiologice;

— corticosensibilitatea;

— modul evolutiv şi contextul patologic analog cu AHAI cu Atc la cald.

Negativitatea TCD se poate explica prin:

• natura moleculară a AAC (exemplu AAC de clasă IgA);

• o dispoziţie particulară a moleculelor AAC pe membrana Er (exemplu: în unele cazuri numai TCD anti-lanţuri uşoare kappa sau lambda a detectat prezenţa Atc la suprafaţa eritrocitelor);

• o densitate a moleculelor AAC pe Er mult prea slabă pentru pragul de sensibilitate al tehnicilor clasice (27). Utilizând tehnici sensibile se poate demonstra autosensibilizarea *in vivo* a Er. Testul de referinţă rămâne „testul de consum" al antiglobulinei fixând complementul (CAFC) graţie căruia s-a putut demonstra că pragul de sensibilitate al TCD standard se situează la $\geqslant 200$ de molecule IgG pe eritrocit. Densitatea IgG pe eritrocitele bolnavilor afectaţi de AHAI cu TCD negativ este < 200 de molecule, iar la indivizii normali sau bolnavii cu anemie hemolitică neimunologică este sub 35—25 de molecule. Aceşti autoanticorpi sunt în general de clasă IgG, nefixatori de complement. Specificitatea este variabilă, dar foarte asemănătoare celei a auto-Atc calzi din AHAI obişnuite (48).

Evoluţia AHAI cu TCD negativ reproduce destul de fidel pe aceea a AHAI cu TCD pozitiv, dar cu un prognostic mai bun.

Existenţa unei hemolize uneori severă în prezenţa unei cantităţi mici de AAC şi în absenţa complementului nu a fost încă explicată.

ANEMII HEMOLITICE (AH) INDUSE DE ALLOANTICORPI (alloimune)

Sunt întâlnite în două situaţii clinice: hemoliza posttransfuzională şi boala hemolitică a nou-născutului.

HEMOLIZA POSTTRANSFUZIONALĂ

Este observată în două circumstanţe: accidentul transfuzional provocat de Atc naturali (regulari sau iregulari) şi accidentul transfuzional provocat de Atc imuni. Incidentele legate de acţiunea Atc naturali ies din cadrul propriu-zis al reacţiilor prin alloimunizare deoarece aceşti Atc sunt preexistenţi transfuziei incompatibile.

Etiopatogenie. Accidentele posttransfuzionale cu Atc imuni apar în legătură cu sistemele antigenice faţă de care nu există Atc naturali preformaţi. Mecanismul alloimunizării a fost descris în secţiunea introductivă. Generarea allo-Atc este legată de 2 factori: imunogenicitatea Atg eritrocitare şi capacitatea de reacţie imună a receptorului. Sistemele cele

mai antigenice sunt Rh (D) şi Kell, urmate în ordinea frecvenţei de Duffy şi Kidd.

Exemplul clasic este cel al imunizării anti-Rh (D). Dacă în vreo împrejurare o persoană Rh-negativă a primit o transfuzie cu eritrocite Rh-pozitive se va imuniza şi va produce allo-Atc imuni anti-Rh. În cadrul acestui răspuns primar, Atc anti-D se constituie lent, devenind decelabili după 1—2 luni de la transfuzie. Acest fapt permite supravieţuirea îndelungată a primelor eritrocite transfuzate: majoritatea sunt îndepărtate din circulaţia receptorului prin mecanismele normale care operează asupra eritrocitelor senescente (44). Titrul allo-Atc elaboraţi în urma răspunsului primar declină lent, într-atât încât pot deveni nedecelabili la testele de triaj. Sensibilizarea receptorului este însă permanentă: la o nouă expunere, subiectul în cauză va riposta mai rapid, producând Atc de clasă IgG (răspuns secundar). Aceştia se ataşează pe Atg Rh, nu activează complementul şi mediază o hemoliză extravasculară prin intermediul macrofagelor splenice. Dacă volumele transfuzate sunt mari, la acest *clearance*, se asociază şi participarea celulelor Kupffer. În aceste condiţii o oarecare cantitate de hemoglobină, care nu ajunge să fie prelucrată intercelular se poate „prelinge" din macrofage producând o hemoglobinemie moderată ($\leqslant$140 mg/dl) şi, inconstant, chiar şi hemoglobinurie pasageră. Macrofagele sunt capabile să încorporeze într-o unitate de timp doar un număr limitat de eritrocite din multitudinea de astfel de celule pe care le captează pe suprafaţă (28). Drept urmare, un număr de eritrocite se pot desprinde şi reintra în circulaţie. Multe dintre ele au aspect de microsferocite deoarece au suferit leziuni ale membranei în timpul contactului cu celulele macrofage. Aceste microsferocite sunt mai rigide şi la o nouă trecere prin cordoanele splenice, vor fi reţinute şi fagocitate.

Tablou clinic. Manifestările clinice sunt expresia răspunsului anamnestic descris mai sus. În cazuri extrem de rare ele pot fi atât de discrete încât pot rămâne nesesizate. Semnalul care atrage atenţia asupra unei astfel de împrejurări este lipsa de eficienţă a transfuziei în corectarea anemiei bolnavului. În aceste cazuri, titrul Atc este redus şi probele de compatibilitate efectuate înaintea administrării pot fi negative. Regula generală a reacţiilor alloimune este apariţia lentă a simptomelor clinice. Cel mai frecvent, această latenţă este de circa 45 de minute. Semnele şi simptomele se instalează în secvenţa hipotermie, frison, febră, adinamie, subicter. În sânge se observă iniţial leucopenie şi, ulterior, leucocitoză (prin mobilizarea rezervelor medulare) şi microsferocite. Testul Coombs direct poate deveni pozitiv. Tratamentul constă din cuparea reacţiei pirogene (antipiretice) şi a imunoaderenţei eritrocitelor sensibilizate la macrofage (corticosteroizi).

La o altă categorie de bolnavi manifestările clinice se instalează şi mai lent, după 7—14 zile. Expresia conflictului imun este subicterul. Asemenea reacţii întârziate pot apărea în două circumstanţe: a) după o imunizare prealabilă atât de veche a receptorului încât s-a ajuns la stingerea producţiei de Atc; aceasta explică nedecelarea unei incompatibilităţi în momentul alegerii donatorului care pare sigur deşi în realitate poate fi incompatibil; în această situaţie este necesar un timp mai lung pentru ca titrul allo-Atc produşi prin noua stimulare să ajungă

la cota de eficiență; b) administrare de sânge de la un „donator periculos" (donator de grup 0 care prezintă în plasmă pe lângă Atc regulari anti-A și anti-B și Atc imuni anti-A și anti-B: aceștia din urmă vor provoca hemoliza eritrocitelor receptorului).

Prevenirea accidentelor transfuzionale tardive depinde de sensibilitatea testelor serologice utilizate pentru decelarea anticorpilor serici. Deoarece titrul allo-Atc scade cu timpul, 30% dintre ei nu mai sunt decelabili prin testele uzuale la 1—60 de luni de la apariție. Hemoliza posttransfuzională întârziată alloimună a fost denumită „de tip I" deoarece poate induce, în condiții încă neelucidate complet, o reacție autoimună extrem de rară („hemoliza de tip II"). Tipul I apare mai frecvent la femei politransfuzate, cu o frecvență de 1/10 000 transfuzii. Atc incriminați sunt, în ordinea frecvenței, anti-Rh (E, c, C, e), anti-Kidd (JK^a), anti-Kell, anti-Duffy, anti-MN, anti-Ss. Ei produc reacții imunoserologice cu o dinamică distinctă pe parcursul desfășurării hemolizei (tabelul 35.III).

TABELUL 35.III

Evoluția imunoserologică a hemolizei posttransfuzionale alloimune întârziate (60)

Testul	Înainte de transfuzie	Fazele hemolizei întârziate		
		Precoce	Intermediară	Tardivă
Coombs direct	—	+	+	—
Coombs indirect	—	—	+	+
Eluat		+	+	—

Spre deosebire de allo-Atc, *izo-Atc naturali* (regulari sau iregulari) produc reacții posttransfuzionale imediate și energice. Aproximativ 90% din accidentele transfuzionale acute provocate de Atc naturali sunt consecința administrării unor eritrocite AB0-incompatibile în raport de Atc regular α sau/și β ai receptorului. Aceștia sunt IgM care se comportă *in vivo* ca aglutinine activatoare de complement. Activarea complementului până la secvențele finale reprezintă elementul fiziopatologic central. Sistemul complement este strâns asociat funcțional cu mecanismele de apărare specifice (răspunsul imun) și nespecifice (inflamație) și cu sistemul coagulării (47). Complementul este activat prin calea clasică de către complexele imune Atg eritrocitare+IgM. Fragmentele C_{3a} și C_{5a} care se formează în etapele intermediare ale activării sunt anafilatoxine, iar complexul de atac al membranei care rezultă în finalul activării, mediază hemoliză intravasculară. Activarea complementului poate antrena și activarea sistemică a coagulării, atât direct (prin activarea factorului XII), cât și indirect prin tromboplastina eliberată din eritrocitele lizate în vase. Din activarea satelită a coagulării rezultă formarea de bradikinină (mediată de factorul XII activat) și coagulopatie de consum, iar acest cortegiu de tulburări este completat cu activarea trombocitelor din care sunt eliberate histamină și serotonină. În final acumularea substanțelor vasoactive produce starea de șoc. Funcția renală este deosebit de periclitată de acțiunea combinată de 4 factori:

1) lezarea vaselor glomerulare prin depunere locală de complexe imune citotoxice, alcătuite din membrane eritrocitare, Atc și complement; 2) obstrucția glomerulară prin microtrombii generați în cursul fenomenului de coagulare intravasculară diseminată; 3) vasoconstricția; 4) hipotensiunea arterială. Prelungirea conflictului duce la insuficiență renală ireversibilă și la deces (24, 26). Rata mortalității, exprimată în raport de numărul de transfuzii aplicate variază între 1/8 300 și 1/33 500 (33). Există o relație evidentă între cantitățile de sânge incompatibil primite de bolnav și gravitatea tulburărilor induse: transfuziile mici ($\leqslant$200 ml) produc în general numai oligurie (25% din cazuri); după cantități cuprinse între 200 ml și 500 ml pot surveni în plus sindromul de coagulare intravasculară diseminată (22% din cazuri) și exitusul (33% din cazuri); dacă s-au introdus cantități și mai mari procentele respective cresc aproape la dublu (23). Evident, aceste cantități mari nu ar putea fi administrate decât subiecților aflați sub narcoză, care șterge complet simptomatologia clinică. În această situație alarma este dată de instalarea a 2 semne insolite: prăbușirea tensiunii arteriale în ciuda controlului riguros al pierderilor intraoperatorii și instalarea sângerărilor nestăpânite și difuze din plaga operatorie asociate cu scurgeri de sânge din orificiile de venopuncție.

La subiectul la stare de veghe manifestările clinice sunt imediate: anxietate extremă, lombalgii difuze (provocate de obstrucția microcirculației cu eritrocite aglutinate), congestia fluxionară a feței și erupții urticariforme, tahipnee, tahicardie, vărsături, hipotensiune și uneori stare de șoc. După 30—60 de minute se instalează febra, precedată sau nu de frisoane. Primele urini eliminate pot fi hemoglobinurice, dar oligoanuria poate surveni în contextul hipotensiunii, ca prodrom al insuficienței renale. Instalarea sindromului de coagulare intravasculară diseminată (CID) este sugerată de asocierea microtrombozelor periferice și a fenomenelor hemoragipare (purpură, echimoze, sufuziuni).

Examene de laborator. Hemograma arată anemie severă (ca efect combinat al hemolizei și al hemoragiilor), leucopenie cu monocitopenie (prin consum în cadrul fenomenului de *clearance* al complexelor imune) și eventual scăderea numărului trombocitelor (prin consum în cadrul CID). Alte teste evocatoare sunt hiperbilirubinemia indirectă și prăbușirea haptoglobinemiei (markerii hemolizei intravasculare) împreună cu alterarea probelor standard de coagulare, în prezența monomerilor de fibrină (semnalele CID). Alte investigații necesare sunt retestarea compatibilității și cercetarea Atc iregulari.

Tratamentul vizează: oprirea conflictului (suprimarea transfuziei suspecte de la primele semne de alarmă), menținerea sub control a diurezei, a irigatului renal și a tulburărilor hemostazei, combaterea șocului și depășirea insuficienței renale. Primele măsuri sunt hidratarea parenterală (cu cristaloide sau cu coloide, după caz) și reverificarea grupei sanguine a bolnavului și a sângelui administrat. Aceasta permite administrarea în continuare de eritrocite spălate izocompatibile pentru corectarea hipoxanemiei. Pentru menținerea diurezei se administrează furosemid i.v. (3 mg/kg, până la 1 g/24 h). Dacă tensiunea arterială nu poate fi menținută se poate administra dopamină (10 $\mu g/m^2/min$) diluată în punga

de perfuzie. Pentru combaterea CID se recomandă perfuzii cu plasmă proaspătă (20 ml/kg/24 h) şi cu concentrate plachetare (1 unitate/10 kg/12 h); heparinoterapia în doze mici-medii poate fi recomandată în formele severe de CID nestăpânite prin cele semnalate mai sus. Instalarea insuficienţei renale severe impune dializarea.

INCOMPATIBILITATEA FETO-MATERNĂ: BOALA HEMOLITICĂ A NOU-NĂSCUTULUI (BHNN)

BHNN este expresia clinică a incompatibilităţii feto-materne (situaţia în care eritrocitele fetale exprimă Atg moştenite de la tată, care lipsesc din repertoriul antigenic al mamei).

Etiopatogenie. Pasajul eritrocitelor fetale la mamă provoacă imunizarea mamei împotriva acestor Atg străine. Atc imuni produşi de mamă sunt de tip IgG care, putând străbate placenta, sunt capabili să inducă hemoliză la făt.

Pasajul transplacentar al eritrocitelor fetale este un fenomen obişnuit în sarcină (14). Eritrocitele fetale se deosebesc de cele materne deoarece conţin hemoglobină F, care este mai rezistentă în mediu acid. Această particularitate reprezintă principiul testului Kleihauer (17), cu ajutorul căruia eritrocitele fetale pot fi depistate începând cu primul trimestru al sarcinii la aproximativ 30% din gravide. Titrul obişnuit al eritrocitelor fetale în circulaţia maternă pe parcursul sarcinii nu depăşeşte 0,1 ml, dar creşte în timpul travaliului şi mai cu seamă dacă se recurge la operaţie cezariană, la aplicarea forcepsului sau la extragere manuală a placentei. Chiar şi avorturile (spontane sau provocate) măresc pasajul transplacentar al eritrocitelor fetale. Teoretic orice Atg eritrocitar poate induce imunizarea gravidei dar, în practică, cel mai frecvent implicate sunt Atg sistemului AB0 (2/3 din cazuri) şi cele ale sistemului Rh (în special Atg D care este foarte imunogen). Imunizarea anti-A şi anti-B apare aproape exclusiv la mame de grup 0. Imunizarea anti-Rh apare la mame Rh-negative.

• **Alloimunizarea de sarcină în sistemul Rh.** În 1939, Levine şi Stetson (34) au identificat în serul unei femei care născuse un copil cu BHNN, un Atc iregular capabil să provoace nu numai hemoliza eritrocitelor nou-născutului, dar şi hemoliza unui număr foarte mare de specimene de eritrocite compatibile AB0 cu parturienta, provenite de la donatori sănătoşi printre care şi tatăl copilului. Ei au conchis că mama s-a imunizat în cursul sarcinii împotriva unui Atg străin prezent pe eritrocitele fătului, pe care acesta l-a moştenit de la tată. Acest antigen denumit în prezent „D" este unul din cele 39 de antigene care fac parte din sistemul extrem de polimorf al grupului Rh. Optzeci şi cinci la sută din persoanele de rasă albă exprimă Atg D pe eritrocitele lor şi sunt numite în vorbirea curentă „Rh-pozitive".

Producţia Atc anti-Rh este declanşată numai printr-o imunizare. De regulă, imunizarea transplacentară a mamei începe când sarcina este foarte avansată (mult prea târziu pentru a se răsfrânge asupra fătului) sau abia în cursul travaliului. Din acest motiv prima sarcină Rh-incompa-

tibilă produce sensibilizarea mamei (răspunsul primar) în timp ce primul născut nu face boală hemolitică. Ulterior, după fiecare sarcină Rh-pozitivă mama se imunizează tot mai intens și mai precoce și copiii respectivi fac boală hemolitică.

Ca efect al intervenției unui număr de factori conjuncturali sensibilizarea primară a mamei nu este un fenomen obligatoriu: se limitează la 5—9% din totalul gravidelor Rh-negative purtătoare de sarcină Rh-pozitivă (63). Cei mai importanți dintre acești factori protectori par a fi: 1) bariera circulației placentare care limitează inoculul cu eritrocite fetale; 2) sechestrarea și liza eritrocitelor fetale senescente de către macrofagele din splina mamei; 3) liza eritrocitelor fetale mediată de izoaglutininele naturale α sau/și β existente în circulația mamei, dacă aceasta și fătul sunt incompatibili în sistemul AB0; 4) secreția crescută de estrogeni și gonadotropine corionice, specifică sarcinii, care au efecte imunodepresoare; 5) aptitudine constituțională redusă pentru imunizare a unora dintre femeile gravide.

Traversarea placentei de anticorpii IgG materni este posibilă grație unor interrelații care se stabilesc între celulele trofoblastice și un „situs de transfer" plasat la nivelul porțiunii Fc a moleculelor Ig. Pasajul anticorpilor materni la făt este lent și redus, iar concentrația lor în sângele fetal atinge abia 8% din valoarea nivelurilor existente la mamă (22). Odată ajunși în circulația fetală, anticorpii se atașează pe antigenele D ale eritrocitelor fetale. Eritrocitele învelite cu anticorpi aderă la receptorii anti-Fcγ exprimați de macrofagele splenice, care ulterior le fagocitează. Procesul acesta de hemoliză extravasculară începe din viața intrauterină și, dacă fătul nu moare *in utero*, se continuă și după naștere până la epuizarea anticorpilor liberi și a eritrocitelor sensibilizate.

Tablou clinic și paraclinic. Intensitatea hemolizei dictează aspectele clinice. Formele grave conduc la anasarcă (*hydrops fetalis* sau anasarcă fetoplacentară) și la moarte *in utero* în peste 80% din cazuri. Hipoxia tisulară, secundară anemiei hemolitice, generează creșterea compensatorie a eritropoiezei, la care participă activ și ficatul fetal. Hiperplazia insulelor eritropoietice hepatice are 3 consecințe: hepatomegalie progresivă; descărcarea lesnicioasă de eritroblaști în circulație (de aici denumirea de eritroblastoză fetală utilizată mult în trecut); distorsiunea cordoanelor de hepatocite, cu răsunet negativ asupra unor procese de sinteză (al albuminei, printre altele) și cu stânjenirea circulației portale și ombilicale. La dezvoltarea stării hidropice a fătului, factorul hotărâtor prin constanța sa, ar fi disfuncția hepatică (prin hipertensiunea portală și hipoalbuminemie), în timp ce anemia, foarte variabilă ca intensitate (și care, eventual, poate genera insuficiență cardiacă), pare să joace doar un rol secundar (33). În condițiile optime de diagnostic și tratament precoce, circa 10% dintre feții hidropici se pot naște vii, prezentând anemie, eritroblastemie, hepatosplenomegalie și retenție hidrică (edeme periferice și pulmonare și revărsate în seroase). În majoritatea cazurilor acești copii nu pot fi menținuți în viață (8).

Formele mai ușoare de hemoliză sunt mult mai numeroase ca precedentele. Nou-născuții pot fi aparent normali și fără edeme. Hepatosplenomegalia și eritroblastoza sanguină sunt cvasiconstante. Ele exprimă efortul de compensare eritroidă a organismului copilului, ca reacție la

hipoxia tisulară generată de anemia hemolitică. În ciuda hemolizei, icterul este aproape nedecelabil la naștere, deoarece bilirubina care se eliberează în plasma fătului difuzează prin placentă și este conjugată în ficatul gravidei. Odată cu nașterea acest mecanism de protecție dispare. Bilirubina indirectă (productul catabolismului protoporfirinei eliberate în urma hemolizei) nu poate fi conjugată integral în ficatul neonatal din cauza deficienței fiziologice în glucuronil transferază. Fiind liposolubilă, bilirubina indirectă (neconjugată) nu poate fi excretată prin bilă și se acumulează rapid în circulația nou-născutului, proporțional cu intensitatea hemolizei (12). Când nivelul bilirubinei crește peste 150 mg/l (31) apare icterul și, de regulă, acest eveniment se produce din primele 24 de ore după naștere. Inițial bilirubina indirectă se cuplează cu serumalbumina care o reține în plasmă. Când toată albumina disponibilă este saturată, bilirubina liberă pătrunde, grație liposolubilității sale, în celule, unde se comportă ca substanță toxică. Cele mai periclitate sunt celulele nervoase din cauza conținutului excesiv în lipide al membranelor externe. Acumularea bilirubinei în nucleii de la baza creierului produce icterul nuclear. Această encefalopatie reprezintă cea mai gravă complicație a BHNN. La niveluri de bilirubină mai mari de 300 mg/l riscul instalării icterului nuclear depășește 72% din cazuri (43). Icterul nuclear se manifestă prin țipăt continuu, convulsii opistotonus și tulburări respiratorii (cauza principală a morții, care survine în primele 12 ore după instalarea lor). Puținii copii care supraviețuiesc ($\leqslant 10\%$) și care de regulă se recoltează dintre cei fără complicații respiratorii, rămân cu sechele neurologice și mentale permanente.

În cazuri foarte rare anemia se dezvoltă tardiv, după perioada neonatală (45), în legătură, probabil, cu 2 factori: persistența Atc anti-Rh și deprimarea eritropoiezei. Apare ca o anemie cu reticulocitopenie care atinge nadirul cam în săptămâna a 3-a și se ameliorează spontan prin săptămâna a 8-a de viață.

Cu această excepție, anemia din BHNN este regenerativă. Eritrocitele sunt ușor macrocitare și bine încărcate cu hemoglobină, iar reticulocitele și eritroblaștii apar în număr mare. Numărul trombocitelor este normal. În schimb, numărul leucocitelor crește adesea peste valorile normale ale acestei perioade de viață ($15-20\times10^9$/l), cu deviere la stânga a formulei leucocitare. Cazurile extrem de grave se pot însoți de pancitopenie și de purpură trombocitopenică.

Diagnostic. Posibilitatea dezvoltării unei sarcini incompatibile trebuie suspectată ori de câte ori este depistat un cuplu în situație de risc. Diagnosticul prenatal se bazează pe urmărirea serologică a mamei, pe aprecierea titrului bilirubinei în lichidul amniotic, pe ecografie și pe determinarea Rh-ului pe eritrocitele fetale.

Cercetarea allo-Atc anti-Rh în serul gravidei trebuie întreprinsă periodic pe parcursul sarcinii, în săptămânile 18, 28—32 și apoi la fiecare 1—4 săptămâni, după caz (33). Titrul anticorpilor este determinat de cea mai mare diluție a serului matern care mai poate produce o reacție pozitivă în testul Coombs indirect (17). Depistarea imunizării mamei, dacă nu este efectul unor transfuzii de sânge administrate în prealabil din diverse motive medico-chirurgicale, reprezintă primul semnal de alarmă. O creștere rapidă a titrurilor sugerează un risc fetal

important și constituie o indicație pentru efectuarea amniocentezei. Aceasta este posibilă din săptămâna a 28-a de sarcină. Puncția amniotică se execută sub control ecografic pentru a se evita lezarea placentei. Materialul recoltat trebuie protejat de expunerea la lumină, care provoacă oxidarea bilirubinei. Bilirubina rezultată din hemoliză difuzează în lichidul amniotic (mecanismul este necunoscut) cu atât mai mult cu cât hemoliza este mai intensă. Concentrația bilirubinei se determină spectrofotometric printr-o înregistrare grafică a absorbției luminii (a densității optice=DO) la diverse lungimi de undă, între 320 și 700 nm. În absența bilirubinei, valorile DO care corespund scalei lungimilor de undă, se dispun în linie. Prezența bilirubinei deformează această dispoziție, provocând apariția unei cocoașe cu înălțimea maximă în dreptul lungimii de undă de 450 nm (care corespunde absorbției optime a pigmentului). Valorile milimetrice ale înălțimii cocoașei sunt convertite apoi în mg. Interpretarea rezultatului ține seama de poziția pe care acesta o va ocupa pe o altă diagramă preformată în care sunt trecute mai multe valori ale DO înregistrate la un lot martor în dinamica evoluției sarcinilor respective (10, 35). Diagrama delimitează 3 zone cu semnificație prognostică: 1) absorbție optică normală sau ușor modificată=fără risc pentru evoluția sarcinii; 2) valori mediu crescute=risc moderat, agravări posibile (implică repetări ale determinării, pentru evaluarea variației intensității hemolizei și expectativă terapeutică armată); 3) valori ridicate=*risc de moarte intrauterină.*

O altă metodă de diagnostic este determinarea fenotipului Rh pe celule fetale. Acestea pot fi izolate din lichidul amniotic (62) sau prelevate prin fetoscopie, o metodă invazivă aplicabilă numai în servicii specializate (33).

Ecografia servește la ghidarea amniocentezei și la aprecierea existenței edemului fetoplacentar pentru care pledează hepatomegalia, ascita și îngroșarea placentei.

Dacă din diferite motive nu s-au întreprins procedurile de diagnostic prenatal, recunoașterea BHNN la naștere se bazează pe următoarele date: 1) triada anemie, eritroblastemie, hiperbilirubinemie indirectă; 2) demonstrarea nepotrivirii Rh între nou-născut și mamă; 3) demonstrarea existenței anticorpilor imuni pe eritrocitele nou-născutului și în serul mamei.

Dozarea hemoglobinei în sângele cordonal permite aprecierea anemiei constituite *in utero*. Valorile mai mici de 14 g/dl sunt considerate patologice. Urmărirea în dinamică a valorilor hemoglobinei este obligatorie în primele zile după naștere. O atitudine similară trebuie avută și în ceea ce privește bilirubinemia — semnalul iminenței instalării icterului nuclear. Determinările privesc bilirubina indirectă (liberă și legată cu albumina) și bilirubina directă. O hiperbilirubinemie indirectă mai mare de 40 mg/l în sângele cordonal recoltat la naștere sau o creștere rapidă a bilirubinemiei indirecte în sângele venos pe parcursul următoarelor 24 de ore, către pragul de 300 ml/l, sunt indicații absolute pentru exsanguinotransfuzie (precizăm că la nou-născutul normal aceste cifre rareori depășesc valoarea de 130 mg/l în primele 48 de ore). Evidențierea unor titruri mari de bilirubină neconjugată liberă în asociere cu hiposerinemie este de asemenea o indicație terapeutică (aport de

albumină, exsanguinotransfuzie), chiar dacă bilirubinemia este inferioară pragului critic. Valorile bilirubinemiei directe sunt mici la naștere, dar cresc progresiv ca expresie a maturării enzimatice a ficatului copilului.

La nou-născut, testul Coombs se efectuează de preferință pe sânge venos (gelatina Wharton care poate contamina sângele cordonal este un factor potențial de eroare). Un test Coombs direct cu ser monospecific anti-IgG atestă afectarea copilului (prezența Atc imuni atașați pe eritrocite).

Testul Coombs indirect este pozitiv la mamă demonstrând prezența anticorpilor circulanți. Serul matern poate fi testat pe un panel de eritrocite cu fenotipuri cunoscute pentru a i se determina specificitatea.

Testul Coombs direct este cel mai important test pentru diagnosticul BHNN anti-Rh. Permite diagnosticul diferențial cu alte stări cu prezentare clinică asemănătoare, în care rezultatele sunt negative: hemolize neonatale (sferocitoza ereditară, enzimopatii), *hydrops fetalis* nonimun (α_1 talasemia homozigotă) sau alloimunizarea fetomaternă AB0 (vezi mai jos).

Tratamentul începe din perioada intrauterină, se continuă până la amendarea procesului imun și are ca scop salvarea copilului.

În perioada prenatală orientarea terapeutică este dictată de anemie și de starea de *hydrops fetalis*. Metodele eficace sunt: nașterea prematură, transfuzia fetală și supresia imună a mamei (Ig injectate i.v. sau plasmafereză cu schimb de plasmă). Ele își au indicația în formele grave care pericliteză viața fătului. În aceste situații firul roșu al conduitei terapeutice este menținerea fătului în viață până ce devine posibilă evacuarea lui din uter.

Nașterea prematură nu poate fi indicată înainte de săptămâna a 32-a a sarcinii și de atingerea maturității pulmonare (dedusă din raportul lecitină/sfingomielină în lichidul amniotic) (9). Dacă aceste două condiții sunt îndeplinite și fătul este în mare risc vital (ΔDO_{450} în zonele 2 sau 3 — vezi mai sus) nașterea prematură poate fi efectuată. În celelalte cazuri, manevra este temporizată și fătul este susținut cu ajutorul transfuziilor, cu eritrocite compatibile cu anticorpii materni aplicate intraperitoneal (36) sau direct în vena ombilicală cateterizată sub ghidaj sonografic (5).

Manevrele imunosupresoare au eficiență limitată. S-au încercat dozele mari de Ig i.v. (400 mg/kg/zi$\times$5 zile) sau schimbul de plasmă (10—20 l/săptămână), în situațiile care nu se pretează la evacuarea fătului sau la transfuzarea sa.

Tratamentul postnatal are 2 obiective: monitorizarea bilirubinemiei pentru prevenirea icterului nuclear și ameliorarea anemiei. Metodele cu eficacitate controlată sunt exsanguinotransfuzia și fototerapia. Decizia pentru exsanguinotransfuzie este condiționată de nivelurile bilirubinemiei. Pentru înlocuire se recomandă sânge Rh-negativ, izo-AB0 dacă mama și copilul sunt compatibili, sau de grup 0, în caz contrar. Exsanguinotransfuzia cupează hemoliza și ameliorează anemia. Albumina (1 g/kg/zi) poate fi asociată la prematurii hipoalbuminemici, cu scopul de a crește capacitatea plasmei de legare a bilirubinei. Fototerapia (expunerea nou-născutului la lumină albastră) produce conversia bilirubinei

indirecte în izomeri hidrosolubili nontoxici. Este un bun tratament adjuvant, deoarece scade nevoia de exsanguinotransfuzie (fără însă să i se substituie). Nou-născuții anemici, care nu necesită manevrele de mai sus, pot primi perfuzii cu eritrocite compatibile. În fine, copiii cu anasarcă, cu anomalii respiratorii și hipoxie, cu acidoză, cu trombocitopenie severă dublată de fenomene hemoragipare, necesită îngrijiri în unități specializate de terapie intensivă.

Protecția gravidei împotriva alloimunizării anti-D implică 3 aspecte: 1) evitarea transfuziilor necontrolate minuțios și fără indicații ferme; 2) evitarea supunerii gravidei la manevre nejustificate care comportă riscul hemoragiilor transplacentare și 3) imunoterapia pasivă cu Ig anti-D. Mecanismul de acțiune al acesteia este ipotetic: învelirea eritrocitelor fetale și potențarea eliminării lor rapide din circulația maternă înainte să se producă sensibilizarea acesteia. Procedura nu este riscantă pentru făt. Doza utilă este de 300 μg dacă administrarea este intramusculară sau 100 μg dacă se utilizează calea intravenoasă. Fiind o imunizare pasivă, se asigură numai o protecție limitată în timp. Poate preveni numai imunizarea primară și nu are nici un efect dacă aceasta s-a produs în prealabil. De aceea imunizarea trebuie instituită de la prima sarcină cu risc, din a 28-a săptămână de evoluție a acesteia sau ori de câte ori gravida este supusă unor manevre care facilitează hemoragia transplacentară. Dacă nou-născutul este Rh-pozitiv parturienta va primi o nouă doză. Pentru control se utilizează testul Kleihauer: un test negativ la 24 de ore de la administrare atestă eficacitatea procedurii. Persistența eritrocitelor fetale (test pozitiv) impune repetarea dozei. Imunizarea pasivă cu Ig anti-D reduce de 10 ori frecvența sensibilizărilor. Eșecurile sunt rare (<1,5%) (31).

• **Alloimunizarea de sarcină în sistemul AB0.** Deși imunizarea anti-A sau anti-B este destul de frecventă, accidentele hemolitice secundare sarcinilor incompatibile sunt mult mai rare și mai puțin severe, decât cele înregistrate în alloimunizarea anti-D. Aceasta se explică prin asocierea unor elemente conjuncturale care protejează fătul și care implică atât Atg cât și Atc imuni. Substanțele A și B sunt exprimate nu numai pe eritrocite. Ele apar larg distribuite pe țesuturile fetale și pe celulele endoteliului placentar. Această masă imensă de Atg fixează Atc materni, stânjenind accesul lor la eritrocitele fetale. Al 2-lea factor limitativ este capacitatea mai mică a eritrocitelor fetale de a fixa Atc, care se datorează unei exprimări mai reduse a Atg. În fine Atc imuni respectivi au putere hemolitică mai slabă. Cu toate acestea pot fi înregistrate și cazuri cu hemolize mai severe, manifestate mai ales după naștere prin paloare, icter și anemie microsferocitară. Icterul nuclear este însă foarte rar.

Imunizarea femeilor poate avea 2 mecanisme care pot coexista: transmiterea Atg de la făt la mamă, sau o heteroimunizare întâmplătoare a mamei. Aceasta din urmă poate fi rezultatul stimulării prin substanțe exogene (alimentare sau bacteriene), care prezintă determinanți identici cu substanțele A și B. Deoarece această imunizare exogenă poate fi anterioară sarcinii, apare posibilitatea rară, ca anemia hemolitică a nou-născutului să apară chiar de la prima sarcină.

Diagnosticul serologic întâmpină unele dificultăți deoarece testul Coombs direct pe eritrocitele nou-născutului este cel mai adesea negativ. În acest caz diagnosticul de incompatibilitate AB0 se poate sprijini pe 2 elemente negative (absența incompatibilității Rh și absența anticorpilor iregulari la mamă) și pe demonstrarea specificității anti-A sau B a Atc eluați de pe eritrocitele copilului (17, 31).

Deoarece anemia severă este rară în acest model de alloimunizare, elementul patologic care dictează tratamentul este nivelul hiperbilirubinemiei. Inițial este încercată fototerapia. În rarele cazuri în care aceasta este inoperantă se aplică exsanguinotransfuzia. Sângele care se administrează trebuie să fie de grup 0, cu Rh corespunzător celui al copilului și compatibil cu serul matern (31, 33, 46).

*

Alte forme rare de BHNN pot fi provocate de alloimunizări cu alte tipuri de antigene care se exprimă pe eritrocite din viața fetală și care provoacă răspuns de tip IgG. Ele pot aparține sistemului Rh sau unor sisteme non-Rh (Kell, Kidd, Duffy). Uneori modelul de boală se apropie de cel al alloimunizării anti-D, necesitând adoptarea unei scheme similare de tratament.

ANEMII HEMOLITICE AUTOIMUNE (AHAI)

AHAI a fost prima boală hemolitică descrisă la om, în care s-a demonstrat rolul patogen al autoanticorpilor (AAC) antieritrocitari în scurtarea duratei de viață a eritrocitelor (19). AAC au specificitate pentru Atg normale ale membranei eritrocitelor. Acestea sunt Atg de grup sanguin cu mare frecvență în populație (Atg „publice") (4, 27, 31). Din acest motiv, AAC acționează neselectiv, atât asupra eritrocitelor autologe cât și asupra eritrocitelor transfuzate spre deosebire de allo-Atc introduși cu ocazia unei transfuzii care interacționează selectiv numai cu eritrocitele receptorului.

Patogenia AHAI nu este bine cunoscută. Se admite conceptul că AHAI apare în condiții care provoacă ruperea toleranței imune, dar aceste condiții, la rândul lor, nu pot fi discutate decât prin prisma unor fapte aparent disparate. Toleranța imună este un proces de „autoeducație" care debutează și se perfectează pe parcursul vieții embriofetale (38). Organismul uman este compus din circa 100 000 de proteine (40) și din alți compuși de bază elaborați progresiv în programul constituirii țesuturilor și organelor și care reprezintă din punct de vedere imunologic o masă enormă de autoantigene („selful"). O parte inerentă a acestui program este diferențierea clonelor de limfocite B și T, printre care unele sunt self-reactive. Pentru a explica instalarea toleranței s-a postulat existența „selecției clonale" (13), un proces de anihilare funcțională sau de eliminare fizică a clonelor autoreactive care operează pe parcursul dezvoltării embrionare. Această purjare ar opera mai eficient asupra clonelor care recunosc Atg cu apariția timpurie în ontogeneză (când se achiziționează selftoleranța), decât asupra clonelor specifice față de Atg

cu apariție târzie în viața prenatală (când se elaborează imunoreactivitatea). Așa s-ar explica subzistența la adultul normal a numeroase subseturi de limfocite B și T autoreactive (7). Un sprijin în favoarea acestei ipoteze derivă din observarea unor tipuri imune de AHAI. Raritatea autoimunizării anti-A și anti-B s-ar explica prin precocitatea exprimării acestor 2 auto-Atg și prin deleția clonală consecutivă. În schimb, fătul nu poate deveni tolerant față de Atg I, care se elaborează progresiv după naștere, împreună cu selecția limfocitelor autoreactive specifice. Acestea subzistă permanent pe parcursul vieții postnatale și secretă mici cantități de AAC anti-I fără ca în mod necesar să provoace AHAI (31, 32, 52).

Prin urmare, în organismele normale, cei 2 parteneri ai reacției imune (auto-Atg eritrocitare și subseturile de limfocite autoreactive specifice lor) pot coexista și pot fi forțați să coabiteze. În condiții normale, clonele autoreactive sunt constrânse la inactivitate (în ciuda presiunii enorme exercitate asupra lor de masa autoantigenelor), grație acțiunii supresoare a unor subpopulații de limfocite T implicate în reglarea imună. Supresia celulelor autoreactive ar fi asigurată de limfocite $TCD8^+$ specifice. Diferențierea, maturarea și menținerea acestor limfocite supresoare în stare activă ar fi asigurată de unele celule T auxiliare *(helper)*, „inductoare de supresie", cu fenotip $CD4^+$ $CD45R^+$ (59). Unele AHAI au fost notate în situații în care această formă de control prin supresie a fost anulată sau deprimată, fie experimental (58), fie ca efect secundar al unor tratamente (Ciclofosfamidă, Ciclosporină A, α-metil-dopa) (11, 29).

Mai multe mecanisme *operează* selectiv în geneza unor AHAI secundare:

• reactivitatea încrucișată și mimarea moleculară ar explica unele forme de AHAI postinfecțioase. În infecția cu *Mycoplasma*, auto-Atc anti-I, care apar în aproximativ 80% din cazuri, au putut fi inhibați de un lipopolizaharid extras din acest germen, sugerând posibilitatea unor epitopi comuni cu substanța I și crossreactivitatea (16). Un mecanism oarecum înrudit ar fi mimarea moleculară, care constă în prezența mai multor determinanți apropiați, pe aceeași moleculă antigenică (sub forma unor secvențe „critice" scurte), dintre care unii se comportă ca heterotopi și alții ca epitopi care mimează Atg ale gazdei. Un patogen care posedă o astfel de configurație ar putea declanșa răspuns imun dacă provoacă o cooperare între limfocitele T (care recunosc epitopul străin) și limfocitele B (care recunosc secvența care mimează selful). Mecanismul a fost incriminat în generarea hemoglobinuriei paroxistice *a frigore* de către infecția sifilitică (52);

• stimularea policlonală a limfocitelor B, prin *triggeri* nespecifici a fost incriminată în unele AHAI survenite în evoluția infecției cu HIV (30), a unor tumori sau în unele modele experimentale ale reacției de grefă-contra-gazdă (G/G). Importanța proliferării policlonale rezidă în faptul că printre clonele activate figurează și clone autoreactive. În reacția cronică G/G, stabilită la șoareci, limfocitele T ale donorului sunt hiperreactivate de Atg HLA de clasa a II-a ale receptorului și secretă, printre altele, cantități mari de interleukină (IL)-6, care joacă rol de activator policlonal al limfocitelor B ale gazdei (18). Mecanismul ar putea explica instalarea citopeniilor imune la pacienții care au primit allogrefă de mă-

duvă osoasă, cu rezerva că la subiecții umani selectarea histocompatibilă a partenerilor diminuează impactul imunostimulant care operează asupra limfocitelor competente;

• activarea nativă a limfocitelor B reprezintă unul din factorii care operează în lupusul eritematos diseminat uman și în modelul murin al acestuia, descris la șoarecii NZB. În puseurile clinice ale LED, limfocitele B proliferează *in vitro* de 10 ori mai intens decât limfocitele B normale și aceasta în absența oricărei stimulări exogene. Mai multe argumente pledează în favoarea unui teren genetic favorizant al acestei anomalii generatoare de reacții autoimune multiple. Printre auto-Atc produși, unii interacționează cu limfocitele T autologe și provoacă o depleție T în cadrul căreia celulele supresoare ar fi vizate preponderent. În acest mod se închide un cerc vicios: hiperactivitate B (nativă? semiautonomă?) ⟶ disfuncția reglării T (prin scăderea supresiei) ⟶ pierderea controlului asupra limfocitelor B autoreactive. Eliberarea unei cohorte de citokine (printre care IL-4 și IL-5) s-ar adăuga ca element de întreținere a procesului (56). Factorii declanșatori posibili ai dereglării imune ar putea fi infecțiile (mai ales cele virale) și unele medicamente. Tulburarea generală a reglării imune ar explica multiplicitatea specificităților AAC elaborați în LED. Astfel numai legat de AHAI s-au comunicat cazuri în care două familii distincte de auto-Atc (IgG și IgM) operează concomitent asupra eritrocitelor (53, 55), ca și asocierea frecventă de auto-Atc antieritrocitari și antiplachetari cu specificitate diferită (sindromul Evans);

• proliferarea malignă a limfocitelor B poate genera AHAI prin mai multe mecanisme. Unul dintre acestea ar fi transformarea întâmplătoare a unei clone autoreactive antieritrocitare normale, într-o clonă malignă. Trei argumente ar pleda în favoarea acestui mecanism: 1) auto-Atc sunt monoclonali; 2) receptorii imunoglobulinici (sIg) care sunt expuși pe suprafața celulelor maligne și pe unele limfocite B normale circulante ca și auto-Atc produși de clona malignă prezintă același izotip (μ) și un marker idiotipic identic; 3) specificitatea acestor auto-Atc este anti-I, un Atg care se formează târziu în ontogeneză permițând menținerea clonelor autoreactive (42, 57). Un alt mecanism probabil ar fi stimularea nespecifică a celulelor B normale, provocată de dereglarea mecanismului de control prin rețeaua idiotipică. Idiotipul sIg exprimate pe celulele neoplazice poate stimula celule T reactive cu receptori care conțin antiidiotipul complementar, iar acestea la rândul lor amorsează activarea policlonală a celulelor care vor secreta auto-Atc. În aceste cazuri auto-Atc sunt specii policlonale de IgG care se atașează pe eritrocitele-țintă împreună cu antiidiotipurile corespunzătoare (41).

Incidență și clasificare. Frecvența anuală a AHAI este cuprinsă între 1/38 000 și 1/100 000 (27, 52). Ea poate fi întâlnită la toate grupele de vârstă. Se descriu 2 picuri de incidență mai mare: <4 ani (unde predomină formele acute și tranzitorii) și >50 de ani (cu predominanța formelor cronice). La vârsta copilăriei (<16 ani) sunt afectați în special băieții. Ulterior, la adulți se remarcă o preponderență a afectării persoanelor de sex feminin. Unele studii subliniază existența unei predispoziții genetice în apariția AHAI.

AHAI sunt clasificate după criterii imunoserologice și etiologice. Clasificarea serologică se sprijină pe proprietățile definitorii ale auto-Atc,

pe baza cărora sunt recunoscute două entități: AHAI cu Atc activi la cald (~70% din cazuri) și AHAI cu Atc activi la rece. Fiecare dintre aceste două forme pot fi idiopatice sau secundare (tabelul 35.IV).

TABELUL 35.IV

Clasificarea etiologică a AHAI

A. Tipul „la cald"	B. Tipul „la rece"
A1 AHAI idiopatică (50%)	B1 AHAI idiopatică (10%)
A2 AHAI secundară (50%)	B2 AHAI secundară (90%)
Boli cu substrat autoimun	
LED	LED
Dermatomiozita, periarterita nodoasă, sclerodermia, poliartrita reumatoidă, miastenia, sindromul Sjögren. rectocolita hemoragică, sarcoidoza, tiroidita, anemia Biermer	
Neoplasme limfoide	
Leucemie limfatică cronică (LLC), limfoame non-Hodgkin (LMnH), mielom multiplu, boala Hodgkin	LLC LMnH Boala Waldenström
Infecții	
Hepatita, citomegaloviroza, mononucleoza infecțioasă (MI), varicela, gripa	*Mycoplasma pneumoniae*, citomegaloviroza, MI, influenza, gripa, HIV, spirocheta, tripanosoma
Alte tumori	
Chist dermatoid de ovar	Cancer pulmonar, colonic, ovarian
Cancer ovarian, cecal, renal, mamar	Sarcom Kaposi
Medicamente	
α metil-dopa, levodopa, acid mefenamic	

ANEMII HEMOLITICE AUTOIMUNE (AHAI) CU AUTO-ATC LA CALD

Procentul formelor primare (idiopatice) și secundare este relativ egal. Majoritatea formelor secundare sunt datorate bolilor limfoproliferative cronice, lupusului eritematos diseminat și altor boli cu componentă imună. În aceste situații, AHAI poate preceda (cu luni sau ani) instalarea semnelor bolii de bază, poate fi descoperită din momentul diagnosticului acesteia sau poate surveni ca o complicație tardivă a evoluției bolii primare. Aceste particularități obligă practicianul să cerceteze permanent, la bolnavii cu AHAI aparent primare, existența criteriilor de diagnostic pentru boala limfoproliferativă și LED și, invers, să caute activ stigmatele hemolizei autoimune la bolnavii cu limfoproliferări maligne sau cu LED. Cincisprezece până la 20% dintre hipertensivii tratați cu α-metildopa produc auto-Atc antieritrocitari și aproximativ 1% dezvoltă AHAI.

Această discrepanță se explică printr-o acțiune dublă a medicamentului: dezechilibrarea controlului supresiei limfocitelor B autoreactive antieritrocitare (care facilitează declanșarea producției de auto-Atc) combinată cu o inhibiție a macrofagelor (ceea ce ar stânjeni mecanismele efectoare prin care sunt îndepărtate eritrocitele învelite în anticorpi) (11).

Tablou clinic. AHAI primare cu auto-Atc la cald pot fi observate la toate vârstele. Debutul este de regulă insidios și se exprimă prin triada paloare, subicter și hipercromie urinară. Uneori instalarea acestora poate urma unor momente de stres: intervenții chirurgicale, sarcină sau suprasolicitare psihică. Evoluția este cronică (luni — ani) cu oscilații de severitate imprevizibile, dar în general marchează o accentuare lentă a intensității hemolizei. Remisiuni spontane extrem de rare au fost citate. Deoarece în AHAI la cald hemoliza este intrasplenică, solicitarea funcțională continuă a macrofagelor din acest organ provoacă hiperplazierea acestei populații și mărirea ușoară a splinei (1/3 din cazuri). Prin urmare, în boala idiopatică splina devine palpabilă târziu în evoluție. Descoperirea unei splenomegalii de la diagnosticul sindromului hemolitic este un element de suspectare a bolii limfoproliferative și impune desfășurarea protocolului de investigații centrat pe evidențierea acesteia. În cazuri rare debutul poate fi exploziv, cu hipertermie, adinamie și dispnee, care sunt însoțite de paloare, icter franc și (uneori) de hemoglobinurie. Ulterior intensitatea hemolizei se poate stabiliza la o rată mai redusă. Relativ frecvent, *triggerul* acestei hemolize cu debut brutal este infecția virală, care trebuie cercetată activ în toate cazurile cu astfel de manifestări.

Examene de laborator. Principalele modificări cantitative din hemogramă sunt anemia și reticulocitoza. Aceasta din urmă poate fi înlocuită *în cazuri foarte rare* de reticulocitopenie. Scăderea reticulocitelor se însoțește de o anemie severă care necesită transfuzarea unor mari cantități de eritrocite și poate avea două semnificații: 1) un proces hemolitic deosebit de agresiv, în care auto-Atc ajung să elimine și aceste eritrocite tinere pe măsura eliberării lor în circulație și 2) o aplazie medulară (secundară unei boli de bază) sau o eritroblastopenie provocată de acțiunea auto-Atc asupra precursorilor eritroizi din măduva osoasă (39).

Într-un număr de cazuri s-a notat o creștere ușoară a numărului de leucocite și de trombocite.

La inspecția frotiurilor de sânge se constată policromazie (expresia reticulocitozei) și prezența de eritrocite care prezintă stigmatele provocate de contactele cu macrofagele splenice: sfericitizare, ombilicări sau mici proiecții digitiforme. Rareori pot fi remarcate descărcări de eritroblaști și imagini de eritrofagocitoză în monocitele circulante.

Examenul măduvei osoase este obligatoriu. La inspecția frotiurilor medulare pot fi remarcate: hiperplazierea seriei roșii (cu morfologie normală sau, mai rar, în hemolizele intense cu durata mai lungă, cu aspecte megaloblastoide secundare consumului de folați), eritrofagocitoză în macrofage (care apar în număr crescut) și o infiltrație limfoidă moderată (expresie probabilă a dereglării imune) (3). Descoperirea, însă, a unui infiltrat limfoid pronunțat evocă mai degrabă existența unei boli limfoproliferative. O astfel de suspiciune sau recoltarea unui aspirat hipocelular

(evocator de aplazie medulară) impun o verificare prin puncție-biopsie a măduvei osoase.

Diagnosticul comportă 3 etape: 1) suspiciunea clinică; 2) cercetarea existenței markerilor morfologici și biochimici ai hemolizei; 3) confirmarea existenței mecanismului imun în generarea hemolizei prin testul Coombs și alte teste serologice.

Confirmarea existenței markerilor hemolizei este deosebit de importantă: a) prezența lor, la un bolnav suspect, incită la trecerea la investigația serologică; b) în absența lor, un test Coombs direct (TCD) pozitiv nu este suficient pentru afirmarea diagnosticului de AHAI. TCD poate fi fals pozitiv din cauze tehnice (lucru pe eșantioane de sânge parțial coagulate), din cauze biologice (hipergamaglobulinemie) sau a unor tratamente administrate bolnavului (cefalosporine, de exemplu). În plus, TCD poate fi pozitiv la 1/10 000 dintre normali (25).

În prezența markerilor de hemoliză, TCD este elementul cheie al diagnosticului AHAI cu auto-Atc la cald. Testul este pozitiv cu ser antiglobulinic total și în 90% din cazuri și cu ser monospecific anti-IgG atestând prezența auto-Atc de clasă IgG atașați strâns pe Atg eritrocitare. Atc IgG pot fi singuri pe eritrocite (20% din cazuri) sau asociați cu molecule de C_{3d} (60% din cazuri) când apare și o pozitivitate cu ser anticomplement. De regulă, antiserurile standard dau reacție pozitivă atunci când pe eritrocite sunt prinse mai mult de 200 de molecule de IgG. Când densitatea anticorpilor este mai mică testul efectuat cu ser standard rămâne negativ, dar metode mai rafinate de determinare sunt capabile să evidențieze și în aceste condiții anticorpii (50, 51). O altă situație în care TCD cu ser anti-IgG rămâne negativ este aceea în care pe eritrocite se găsesc numai molecule de C_{3d} (10—13% din cazuri). Circa 80% din bolnavii cu AHAI cu auto-Atc la cald prezintă pozitivitate atât la testul direct, cât și la testul indirect cu ser anti-IgG. Testul Coombs indirect evidențiază în aceste cazuri auto-Atc care au rămas liberi în ser. Acest aspect are o semnificație prognostică nefavorabilă deoarece exprimă o încărcătură enormă a circulației bolnavului cu molecule de auto-Atc al căror număr depășește pe acela al antigenelor Rh.

Testarea specificității auto IgG (cu ajutorul unor paneluri de eritrocite cu antigene cunoscute) arată că acestea au de regulă specificitate anti-Rh (cel mai frecvent *anti-e*, rar anti-E) și excepțional alte specificități (4).

Tratamentul formelor primare vizează blocarea mecanismelor hemolizei. Țintele patogenice ale terapiei sunt macrofagele și limfocitele producătoare de auto-Atc. Medicamentele care supresează receptorii macrofagelor (corticosteroizii, Danazolul și Ig cu administrare i.v.) dau răspunsuri rapide (zile) și sunt utilizate, de regulă, ca terapie de atac sau, în urgențe, în timp ce supresia limfocitelor (corticosteroizi, ciclofosfamidă, azatioprină) se instalează lent (săptămâni). Efecte similare se obțin după splenectomie, care elimină fizic atât macrofagele responsabile de *clearance*-ul eritrocitelor învelite cu auto-Atc, cât și un eșantion larg de limfocite imunocompetente.

În formele primare ale bolii tratamentul începe cu administrarea de Prednison (1—2 mg/kg/zi), dacă nu există contraindicații pentru acest

preparat. La bătrânii tarați, infectați, grabatari sau cu osteoporoză, dozele de atac pot fi reduse la jumătate. Răspunsuri prompte (din primele 5—7 zile) se obțin la circa 80% din cazuri, cu ameliorarea dramatică a stării clinice și cu creșterea hemoglobinei (însoțită uneori de o reticulocitoză tranzitorie). Dozele de atac se mențin circa 3—4 săptămâni. După obținerea remisiunii (dispariția anemiei și a semnelor de hemoliză) se trece la reducerea lentă a dozelor. La copii remisiunile sunt mai prompte și, frecvent, durabile, în timp ce la adulți remisiunile durabile sunt rare (circa 1/5 din cazuri). Scăderea dozelor se face în ritm de 5—10 mg/săptămână, tatonându-se doza de întreținere sub care se controlează anemia. În 30—50% din cazuri această doză poate fi ridicată, impunând trecerea la altă formă de tratament. Atunci când hemoliza poate fi controlabilă cu doze mici (10—15 mg/zi), acestea se vor menține, în absența unor contraindicații, încă 3—4 luni, după care vor fi scăzute lent.

Bolnavii care nu pot suporta corticoterapia, cei care demonstrează rezistență primară sau răspunsuri parțiale menținute doar cu doze mari, ca și cei care dezvoltă complicații ale corticoterapiei, constituie lotul candidaților la splenectomie (dacă nu există contraindicații pentru această procedură). Splenectomia induce răspunsuri complete și parțiale în 85% din cazuri. O parte din bolnavii cu răspunsuri parțiale pot fi controlați în continuare cu doze mici de Prednison. Profilaxia infecțiilor tardive postoperatorii, cu vaccinuri antipneumococice și antimeningococice, este recomandată (52). Eșecul după splenectomie sau contraindicațiile acesteia au impus introducerea imunosupresiei cu Ciclofosfamidă (100—150 mg/zi, p.o.) *sau* cu Imuran (125 mg/zi, p.o.) cu care se pot obține răspunsuri pozitive în circa 40% din cazuri.

Ca adjuvante ale terapiei de atac, cu scopul realizării unor răspunsuri prompte la bolnavii cu risc vital, pot fi utilizate Danazolul (400—600 mg/zi, p.o.) sau preparatele de imunoglobuline cu administrare i.v. (400 mg/kg/zi×5 zile) (1, 37). În plus, Danazolul poate fi administrat perioade mai lungi de timp la bolnavii cu răspunsuri parțiale după Prednison, permițând reducerea dozelor acestuia.

Transfuziile cu masă eritrocitară sunt indicate numai la bolnavii care sunt în risc vital din cauza severității extreme a anemiei (6). Eficiența lor este moderată deoarece auto-Atc se cuplează cu eritrocitele transfuzate. În plus alegerea donatorilor poate fi îngreuiată din cauza auto-Atc care pot reacționa cu multe eșantioane de eritrocite în testul antiglobulinic indirect. În aceste situații trebuie exclusă prezența eventuală a alloanticorpilor care poate fi mascată de auto-Atc în titru mare (20). Dacă testele *in vitro* nu permit stabilirea unui donator sigur, se alege din eșantioanele testate pe cel care dă reacția cea mai mică în testul de incompatibilitate (21), iar administrarea sa se va face lent, urmărindu-se permanent comportarea bolnavului în timpul transfuziei.

Prognosticul formelor primare este rezervat. Cel al formelor secundare este dictat de răspunsul bolii de bază la terapia specifică acesteia. Tratamentul principal al formelor secundare de AHAI este tot corticoterapia.

ANEMII HEMOLITICE AUTOIMUNE (AHAI) CU AUTO-ATC ACTIVI LA RECE

Sunt clasificate în două entități, după tipul, specificitatea și modul de acțiune al auto-Atc care le provoacă: boala cu aglutinine la rece (BAR) și hemoglobinuria paroxistică *a frigore* (HPF).

BAR este provocată, în imensa majoritate a cazurilor, de auto-Atc de clasă IgM cu specificitate anti-Ii. Anticorpii se comportă *in vitro* și *in vivo* ca aglutinine. Afinitatea lor pentru Atg.Ii este dictată de amplitudinea termică — o variabilă individuală. Activează complementul pe suprafața eritrocitelor-țintă. De regulă, această activare se oprește la etapa C_{3b}, care mijlocește o hemoliză extravasculară prin atașarea și fagocitarea eritrocitelor astfel învești mântate la nivelul macrofagelor hepatice — celulele Kupffer.

HPF este provocată de auto-Atc bifazici „Donath-Landsteiner". Sunt Atc de clasă IgG, care se atașează la temperaturi scăzute pe Atg eritrocitare P, împreună cu complementul. La temperatură mai ridicată, acesta se activează pe eritrocite până la etapa finală (C_5—C_9), provocând *in vivo* liza intravasculară a eritrocitelor purtătoare. Hemoliza poate fi provocată și *in vitro* dacă sunt respectate condițiile de expunere termică în 2 timpi (testul Donath-Landsteiner) (17).

BAR și HPF se pot prezenta ca boli primare sau secundare.

BOALA CU AGLUTININE LA RECE (BAR)

Forma primară (idiopatică) apare cu maximum de incidență mult după vârsta de 50 de ani, fără preferință etnică sau de sex. Auto-Atc sunt monoclonali (IgM.k) cu specificitate anti-I.

Tabloul clinic este variat: BAR fără semne clinice de hemoliză (în care auto-Atc, cu amplitudine termică foarte joasă se acumulează în plasmă și provoacă tulburări ale vâscozității și ale scurgerii sângelui); BAR cu hemoliză ușoară sau medie (forma cea mai frecventă) și BAR cu hemoliză severă (complicată uneori cu hemoliză intravasculară cu hemoglobinurie: spre deosebire de cele observate în HPF sau, accidental, în unele AHAI cu Atc la cald, crizele hemoglobinurice din BAR nu se asociază cu frisoane, febră sau insuficiență renală). Această versatilitate este corelată cu titrul auto-Atc cu temperatura ambientală și cu amplitudinea termică (factorul cel mai important în determinarea abilității auto-Atc de a activa complementul și în determinarea agresivității bolii) (49).

Forma comună a bolii se manifestă prin hemoliză ușoară/medie, bine suportată, la care se asociază semne de vasoocluzie declanșate de expunerea la frig. Bolnavii sunt palizi, subicterici și astenici, fără splenomegalie. Ocluzia vaselor mici din teritoriile periferice ale capului (nas, obraji, urechi, mâini) survine după expunere la temperaturi scăzute, când se produce aglutinarea *in vivo*. Se manifestă prin acrocianoză, sindrom Raynaud-*like*, *livedo reticularis*, parestezii sau manifestări trofice tegumentare (aspect cadaveric, degenerare trofică sau chiar necroză).

Examenele de laborator esențiale sunt prezentate în tabelul 35.V. Unele sunt comune tuturor AH imune (markerii biochimici ai hemolizei,

TABELUL 35.V

Boala cu aglutinine la rece (BAR): date esențiale pentru diagnostic

1. Semne de hemoliză: anemie, reticulocitoză, hiperbilirubinemie indirectă, urobilinogenurie.
2. Autoaglutinare în eprubetă sau pe lamă la temperatura camerei (ocazional).
3. Aglutinare constantă la +4°C în mediu salin.
4. Titruri ridicate de aglutinine la rece în ser.
5. Test Coombs direct pozitiv cu ser polivalent și cu ser monospecific anti-C_{3d}.
6. Test Coombs direct negativ cu ser monospecific anti-IgG.

policromazia, prezența microsferocitelor). Elementele specifice sunt aglutinarea eritrocitelor și prezența C_{3d} pe eritrocite. Autoaglutinarea la temperatura camerei poate fi uneori remarcată atât în probele de sânge recoltate pe anticoagulant cât și pe lamă (când stânjenește realizarea unor frotiuri corecte). Când are loc, devine o sursă de eroare la determinarea numărătorilor hemogramei (mai ales când aceasta se efectuează în aparate automate). Testul de aglutinare *in vitro*, la +4°C, în mediu salin, are o mare valoare diagnostică (absența aglutinării exclude BAR; un test pozitiv cere obligatoriu titrarea aglutininelor și determinarea amplitudinii lor termice). Testele imunoserologice evidențiază pe eritrocite moleculele de C_{3d} (în absența auto-Atc). Astfel TCD este pozitiv cu ser antiglobulinic (polivalent) și cu ser anti-C_{3d} și este *negativ* cu ser anti-IgG. Această constelație de rezultate este definitorie pentru BAR și net diferită de configurația din AHAI cu auto-Atc la cald, în care pozitivitatea TCD este constantă cu serul antiglobulinic și cu serul anti-IgG și doar facultativă cu serul anti-C_{3d}.

Evoluția acestei forme de BAR este cronică. Exacerbări și remisiuni spontane ale hemolizei au fost notate. Amplitudinea termică este mult mai importantă pentru aprecierea prognostică decât titrul anticorpilor.

Formele secundare ale BAR însoțesc unele infecții, lupusul eritematos diseminat și neoplasme ale limfocitelor B (vezi tabelul 35.IV).

Pneumonia cu *Mycoplasma* și mononucleoza infecțioasă sunt bolile infecțioase care se complică cel mai frecvent cu AHAI cu aglutinine la rece. Aceste boli apar mai des la tineri, iar hemoliza survine în săptămâna a 2-a — a 3-a de la debutul lor, ca un incident pasager. Auto-Atc sunt policlonali cu specificitate anti-I în infecția cu *Mycoplasma* și anti-i în infecția cu virus Epstein-Barr. Intensitatea hemolizei fiind redusă, singura măsură terapeutică recomandabilă este repausul în atmosferă caldă.

În bolile limfoproliferative cronice se produc uneori aglutinine monoclonale anti-i. AHAI este adesea de mică intensitate, astfel că în contextul semnelor bolii de bază poate scăpa neobservată. Uneori relația este inversă. Simptomatologia BAR este evidentă și cea a neoplaziei limfoide este ștearsă. De aceea este absolut obligatoriu ca toți pacienții cu BAR aparent idiopatică să fie cercetați pentru descoperirea unei eventuale limfoproliferări maligne criptogenetice: aceasta poate fi pusă în evidență în aproximativ 1/3 din cazuri (54).

Tratamentul BAR constă din încălzirea bolnavului, imunosupresie (Ciclofosfamidă 100—200 mg/zi, p.o., sau Clorambucil 2—4 mg/zi, p.o.)

și plasmafereze (rezervate cazurilor acute, cu titruri mari de Atc.). Prednisonul nu este eficace, cu excepția unor cazuri rare în care amplitudinea termică a Atc este foarte ridicată (52). Transfuziile se evită pe cât posibil: nefiind protejate de existența de molecule de C_{3d} pe suprafața lor, eritrocitele transfuzate sunt hemolizate rapid (60). Se recomandă ca testele de compatibilitate să se execute la 37°C, iar eșantioanele transfuzate să fie preîncălzite.

HEMOGLOBINURIA PAROXISTICA A FRIGORE

Este cea mai rară formă de AHAI (1—2% din totalul cazurilor). Formele primare sunt rarisime. Cele secundare apar cu precădere la copii după unele viroze (rujeolă, oreion, varicelă, mononucleoză infecțioasă). Crizele de hemoglobinurie se instalează după expunere la frig, fiind precedate de frisoane, febră, lombalgii difuze și crampe abdominale. Durata acceselor variază de la ore la zile, iar anemia care se instalează rapid este adesea profundă. Pe frotiurile de sânge apar poikilocite, macrocite policromatofile și eritroblaști, iar testele biochimice evidențiază hiperbilirubinemie indirectă și prăbușirea valorilor haptoglobinei. Testul de screening constă din provocarea hemolizei sângelui bolnavului (recoltat pe anticoagulant) după o expunere inițială de 1½ ore la gheață urmată de încălzirea la 37°C (17). TCD este în mod obișnuit negativ sau slab pozitiv cu ser anticomplement.

HPF este prima anemie hemolitică imună descrisă în literatura medicală (32). La acea vreme boala era asociată frecvent cu sifilisul secundar sau terțiar. În prezent această asociere este ultra rară.

Tratamentul se adresează bolii de bază plus încălzirea bolnavului. Transfuziile cu eritrocite spălate (pentru a evita introducerea de complement) și încălzite pot fi necesare după crizele de deglobulizare.

ANEMII HEMOLITICE (AH) INDUSE DE MEDICAMENTE

Reprezintă circa 18% din AH dobândite (55). Medicamentele pot induce hemoliza prin 4 mecanisme:

1) *mecanism autoimun:* α-metil dopa provoacă apariția unei auto-IgG anti-Rh(e) active la cald prin dereglarea supresiei clonelor autoreactive (vezi mai sus), la aproximativ 15% dintre persoanele tratate, cu pozitivarea TCD. Circa 1—3% din pacienți dezvoltă o AHAI ușoară. După oprirea administrării AHAI cedează rapid, dar TCD se negativează după 1—2 ani;

2) *„adsorbția nespecifică a unor proteine plasmatice"* pe eritrocitele sensibilizate de medicament poate produce pozitivarea TCD. Medicamentele incriminate ar fi cefalosporinele care ar genera alterări nespecifice ale membranei celulare. Proteinele care se adsorb sunt serinele, fibrinogenul și unele globine. Pozitivarea TCD survine în aproximativ 3% din cazuri și este nespecifică. Eluatele eritrocitare sunt nereactive. Anemia este rară. Mecanismul hemolizei nu este complet elucidat;

3) *mecanismul „haptenic" (tip penicilinic).* Medicamentul se absoarbe pe eritrocit și formează conjugate imune cu proteine ale membranei celulare;

4) *mecanismul „spectatorului inocent"* (tip stibophen). Medicamentul formează conjugate imunogene cu proteinele plasmatice. Acestea se adsorb secundar pe eritrocite împreună cu complementul. Eritrocitele devin în mod „inocent" ţinta mecanismului de îndepărtare a imunogenului.

Pentru alte detalii vezi tabelul 35.VI.

TABELUL 35.VI

Unele mecanisme de AH induse de medicamente
(după 15)

	Tip „penicilinic" (haptenic)	Tip „stibophen" („spectatorul inocent")
Mecanismul sensibilizării	Iniţiat de ataşarea medicamentului la eritrocit Anticorpii se ataşează pe determinantul haptenic	Iniţiat de legarea medicamentului la o proteină plasmatică. Conjugatul împreună cu anticorpul formează complexe imune care aderă pe eritrocit împreună cu complementul
Anticorpul	IgG Hemoliză extravasculară mediată de aderenţa la macrofagele splenice	IgM activatoare de complement Hemoliză mediată de complement (intravasculară dacă activarea C′ a fost completă; extravasculară mediată de C_{3b})
Depistare	Anticorpii eluaţi de pe eritrocitele subiectului produc un test Coombs indirect pozitiv numai cu eritrocite preincubate cu medicamentul cauzal	• Test Coombs direct de tip anticomplement • Serul subiectului produce un test Coombs indirect pozitiv cu eritrocite normale preincubate cu medicamentul cauzal
Medicamente incriminate	Penicilină (i.v. megadoze) Ampicilină, Meticilină, Carbenicilină	Stibophenul (Fuadin), chinidină, chinină, fenacetină, hidroclorotiazidă, Rifampicină, Izoniazidă, Sulfonamide, Clorpromazina, Tetraciclina, Streptomicina, insulina, Melphalan, 5-fluorouracil

Hemoliza la medicamente încetează spontan după oprirea tratamentului agresor.

BIBLIOGRAFIE

1. AHN Y. S., HARRINGTON W. J., MYLVAGANAM R. şi colab.: Ann. Intern. Med. 1985; 102: 298.
2. ARCHER G. T.: Vox Sang. 1965; 10: 590.
3. BAIN B. J., CLARK D. M., LAMPERT L. A.: Bone marrow pathology, Blackwell Scientific Publ., Londra, 1992, cap. 7.
4. BACH J. F., LESAVRE P. H.: Immunologie, Edit. Flammarion — Médecine-Sciences, Paris, 1989, 289.

5. BERKOWITZ R. L., CHITKARA U., GOLDBERG J. D. şi colab.: Amer. J. Obstet. Gynecol. 1986; 155: 574.
6. BETZ L. D.: Human Pathol. 1983; 14, 251.
7. BONA C.: Autoimunitatea. În Gluhovschi Gh. (ed.): Actualităţi în imunologia clinică, Edit. Helicon, Timişoara, 1994, 8.
8. BOWMAN J. M.: Obstet. Gynecol. 1978; 52: 1.
9. BOWMAN J. M.: Alloimmune hemolytic disease in newborn. În Williams W. J. şi colab. (eds.): Hematology, McGraw-Hill Inc., New York, 1990, 687.
10. BOWMAN J. M., POLLOCK J. M.: Pediatrics 1965; 35: 815.
11. BROSTOFF J., SCADDING G. K., MALE D., ROITT J. M.: Immunologie clinique, de Boeck Université, 1992, cap. 16.
12. BROWN A. K., ZUELZER W. W.: J. Clin. Invest. 1958; 37: 332.
13. BURNET F. N.: The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge Univ. Press, Londra, 1959.
14. CHOWN B.: Lancet 1954; 1: 1213.
15. COLIŢĂ A., COLIŢĂ D., DIMA I. şi colab.: Citopenii imune. În Gluhovschi Gh. (ed.): Actualităţi în imunologie clinică, Edit. Helicon, Timişoara, 1994, 555.
16. COSTEA N., YAKULIS V. J., HELLER P.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1972; 139: 476.
17. DACIE J. V., LEWIS S. M.: Practical hematology, Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1984.
18. DOBASHI K., ONO S., MURAKAMI S. şi colab.: J. Immunol. 1987; 138: 780.
19. DONATH J., LANDSTEINER K.: Münch. Med. Wochenschr. 1904; 51: 1590.
20. ENGELFRIET C. P., OVERBEEKE M. A. N., VON DEM BORNE A. E. G. KR.: Semin. Haematol. 1992; 29: 3.
21. FOERSTER J., Autoimmune hemolytic anemia. În Lee G. R. şi colab. (eds.): Wintrobe's Clinical Hematology, Lea & Febiger, Philadelphia-Londra, 1993, cap. 41.
22. GENETET B., MANONI P.: La transfusion, Edit. Flammarion, Paris, 1978.
23. GLASSER L.: Hemolytic transfusion reactions. Clin. Pathol. 1988; 5: 14.
24. GOLDFINGER D.: Transfusion 1977; 17: 85.
25. GORST D. W., ROWLINSON V. I., MERRY A. H. şi colab.: Vox Sang. 1980; 38: 99.
26. GREENWALT T. J.: Semin. Haematol. 1981; 18: 84.
27. HABIBI B.: Sem. Hôp. 1989; 65: 1465—1477; 1533—1541.
28. JANDL J. H.: Blood: Textbook of Hematology, Little Brown Comp., Boston/Toronto, 1987, 285.
29. JENKINS M. K., SCHWARTZ R. H., PARDOLL D. M.: Science 1988; 241: 1655.
30. KOPELMAN R., ZOLLA-PAZNER S.: Amer. J. Med. 1988; 84: 82.
31. LAFONTAINE M., LEBRUN S.: Immuno-hématologie, Edit. Decarie, Montreal, 1985.
32. LANDSTEINER K.: Zentralbl. Bakteriol., Mikrobiol., Hyg. 1900; 27: 357.
33. LEE G. R., BITHELL T. C., FOERSTER J., ATHENS J. W.: Wintrobe's clinical hematology, ed. a IX-a. Lea & Febiger, Philadelphia, 1993.
34. LEVINE P., STETSON R. E.: J.A.M.A. 1939; 113: 126.
35. LILEY A. W.: Amer. J. Obstet. Gynecol. 1961; 82: 1359.
36. LILEY A. W.: Br. Med. J. 1963; 2: 1107.
37. MAC INTYRE E. A., LINC D. C., MACEY M. G. şi colab.: Br. J. Haematol. 1985; 60: 387.
38. MALE D., CHAMPION B., COOKE A.: Advanced immunology. J. B. Lippincott Comp., Philadelphia, 1987, cap. 12.
39. MANGAN K. F., BESA E. C., SHADDUCK R. K. şi colab.: Exp. Hematol. 1984; 12: 788.
40. MARRACK P., KAPPLER J.: Science 1987; 238: 1073.
41. MASOUREDIS S. P., BRANKS M. J., VICTORIA E. J.: Blood 1987; 70: 710.
42. MERLINI G., FARHANGI M., OSSERMAN E. F.: Semin. Oncol. 1986; 13: 350.
43. MOLLISON P. L.: Blood transfusion in clinical medicine, Blackwell Scientific, Oxford, 1972.
44. MOLLISON P. L.: Transfusion 1984; 24: 93.
45. OSKI F. A., NAIMAN J. L.: Probl. Clin. Pediat. 1978; 4: 176.
46. PEEVY K. J., WISEMAN H. J.: Pediatrics 1978; 61: 475.

47. PESCE A. J., DOSEKUN A. K.: Clin. Physiol. Biochem. 1983; 1: 92.
48. ROCHANT H.: În DREYFUS B. (eds.): Hématologie. Edit. Flammarion — Médecine-Sciences, Paris, 1986.
49. ROSSE W. F., ADAMS J. P.: Blood 1980; 56: 409.
50. SALAMA A., MUELLER-EKHARDT C., BAKDI A.: Vox Sang. 1985; 48: 239
51. SALAMA A., BERGHOFER H., MUELLER-ECKHARDT C.: Lancet 1992; 340 (8834—8835): 1515—7.
52. SCHWARTZ R. S., BERKMAN E. M., SILBERSTEIN L. E.: The autoimmune hemolytic anemias. În HOFFMAN R. și colab. (eds.): Basic principles and practice, Churchill-Livingstone, New York, 1991, 422.
53. SHULMAN I. A., BRANCH D. R., NELSON J. și colab.: J. A.M.A. 1985; 253: 1746.
54. SILBERSTEIN L. E., ROBERTSON G. A., HANNAM HARRIS A. C. și colab.: Blood 1986; 67: 1705.
55. SOKOL R. J., HEWITT S., STAMPS B. R.: Br. Med. J. 1981; 282: 2023.
56. STEINBERG A. D., RAVECHE E., KLINMAN D. M.: Rheum. Dis. Clin. North Amer. 1988; 14: 714.
57. STEVENSON F. K., SMITH G. J., NORTH J. și colab.: Br. J. Haematol. 1989; 72: 9.
58. TAGUKI O., NISHIZUKA Y.: J. Exp. Med. 1987; 165: 146.
59. TAKEUKI T., SCHLOSSMAN S. F., MORIMOTO C.: J. Immunol. 1988; 141: 3010.
60. TISSOT J. D., GROB J. P. H., SCHNEIDER F. H.: Méd. Hyg. 1990; 48: 834.
61. TISSOT J. D., SCHNEIDER P. H.: Méd. Hyg. 1992; 50: 1325—1326.
62. WALKER W.: Br. Med. J. 1970; 2, 220.
63. ZIPURSKY A.: Post Grad. Med. 1968; 43: 100.

XXXVI

PORFIRIILE

AL. VÁLCU

Porfiriile sunt tulburări metabolice heterogene, ereditare (uneori câștigate), caracterizate prin tulburări de sinteză și acumulări crescute de porfirine, de precursori porfirinici, sau ambele grupe de produși, însoțite de excreții masive ale acestora prin urină sau fecale. Aceste boli se traduc clinic (în ansamblu sau disociat) prin manifestări cutanate (fotodermatoze), neuropsihice sau gastrointestinale. Fiecare din acest grup de boli este dat de un defect enzimatic specific în biosinteza hemului.

Relativa lor raritate este mai mult aparentă decât reală. Cele mai multe cazuri, mai ales cele cu simptomatologie disociată, au fost etichetate ca afecțiuni neurologice, gastroenterologice, dermatologice, ginecologice etc. Majoritatea porfiriilor se găsesc în stare latentă, fără manifestări clinice (purtători de tară). Anumiți factori (endogeni sau exogeni) sunt implicați în declanșarea manifestărilor care pot apărea, în unele cazuri, ca adevărate drame cu evoluție uneori letală, după cum și cazuri latente pot fi întâlnite în toate tipurile de porfirie umană.

Porfiria trebuie deosebită de „porfirinurie", eliminare urinară de porfirine ce apare în diverse condiții clinice și este lipsită de manifestări proprii.

Incidența. În unele zone geografice, anumite porfirii au o răspândire mare. În Africa de Sud, porfiria variegata este răspândită în rândul populației albe (3‰ locuitori), ceea ce reprezintă circa 12 000 indivizi afectați. În Suedia, porfiria acută intermitentă este întâlnită într-o frecvență de 1‰ de locuitori, de aceea mai este cunoscută ca porfirie suedeză sau laponă, iar în Danemarca, de 1 la 50 000 locuitori. La noi în țară, răspândirea cea mai mare o are porfiria cutanea-tarda, iar dintre porfiriile hepatice, porfiria acută intermitentă.

Clasificarea actuală, deși a suferit multiple transformări, nu poate fi considerată definitivă. Există două grupuri distincte de porfirii: unele ereditare și altele dobândite (secundare). Se cunosc șapte forme distincte

de porfirii ereditare și numeroase forme câștigate, dintre care, la noi în țară, cea mai frecventă este întâlnită în intoxicația cu plumb. Porfiriile ereditare au fost clasificate în două grupe, după predominanța țesuturilor unde se desfășoară sinteza porfirinelor: eritropoietice și hepatice (tabelul 36.I).

TABELUL 36.I

Clasificarea porfiriilor

I. PORFIRII EREDITARE

A. *Porfirii eritropoietice:*
— *porfiria eritropoietică congenitală* (PEC) sau boala Günther și
— *protoporfiria ereditară* (PPE).

Această împărțire nu trebuie interpretată însă în mod rigid. Ultima, prin unele trăsături comune cu porfiriile hepatice, este introdusă de unii autori într-o grupă mixtă:
— *porfiriile eritrohepatice.*

B. *Porfirii hepatice,* în care se disting:
— *forme cu manifestări neurovisceral acute:*
• porfiria acută intermitentă (PAI);
• coproporfiria ereditară (CPE);
• porfiria variegata (PV);
• porfiria cu deficit de AAL dehidrază
— *forme fără manifestări acute,* în care intră o singură porfirie cu manifestări clinice cutanate, dar care are două aspecte patogenice:
• porfiria *cutanea* (PC), care este familială și precoce (de tip II);
• porfiria *cutanea tarda* (de tip I), care nu este, în mod evident, familială și apare, predominant, după vârsta de 35 de ani.

Formele latente reprezintă însă fondul tuturor porfiriilor umane.

II. PORFIRII SECUNDARE

A. *Porfirii de origine toxică:* intoxicația cu plumb (de departe cea mai frecventă), etilismul, intoxicația cu diferite substanțe chimice, izolat sau în masă

B. *Porfirii secundare unor boli endogene*

Patogenie. În porfirii, indiferent dacă sunt ereditare sau dobândite există, la un anumit nivel metabolic, o perturbare a sintezei hemului. În porfiriile ereditare, cauza rezidă într-o mutație la nivelul uneia din cele 8 enzime care catalizează o serie de 7 reacții chimice (fig. XXXVI.1).

Enzimele defecte acționează cu o eficiență scăzută asupra substraturilor pentru care sunt specifice, producându-se acumulări, în general, în „amonte" de locul unde acționează și scăderi în „aval" de acest nivel. Produsul final scăzut (hemul) exercită un retrocontrol (*feed-back* negativ) asupra primei enzime a ciclului, AAL-sintetaza, care este o enzimă limitativă dar, în același timp, și inductibilă. Ea poate acționa, prin sporirea sintezei ei, la antrenarea și creșterea activității întregului ciclu, sub acțiunea unor factori endogeni (de exemplu hormonii estrogeni), sau exogeni (medicamente). Se realizează astfel o compensare a defectului enzimatic pe baza unui dezechilibru de proporții și a altor substraturi ce duc la producții, acumulări și eliminări ale surplusului de produși intermediari aflați în amonte de locul unde preexistă „leziunea biochimică". În porfiriile dobândite, enzima sintetizată, cantitativ și calitativ în condiții

echilibrate, este perturbată în funcția ei de către o substanță toxică (plumb, pesticide, alcool etc.), care interferează cu activitatea ei metabolică.

Porfirinele, prin răspândirea lor mare în natură și prin numeroasele funcții metabolice, au un rol primordial în dezvoltarea și menține-

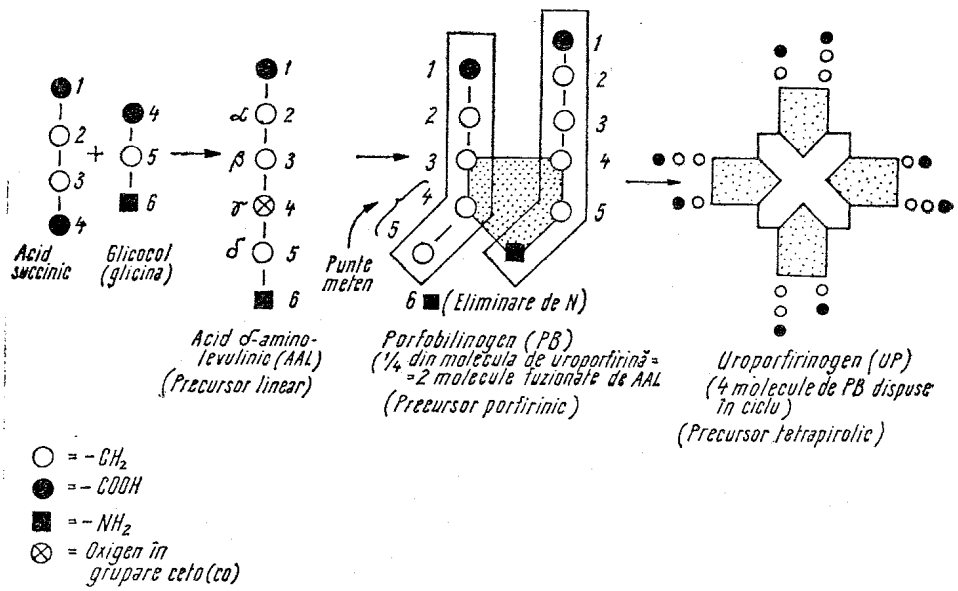


Fig. XXXVI.1. — Reprezentare simplificată a sintezei primului inel tetrapirolic și a primelor faze de sinteză din cele două componente de bază (acidul succinic și glicocolul) care, prin fuzionare, formează acidul aminolevulinic (AAL). Două molecule de AAL alcătuiesc porfobilinogenul (PBG), iar patru molecule de PBG formează prima porfirină, uroporfirinogenul, prin intermediul unui șir de procese enzimatice (vezi fig. XXXVI.2.)

rea vieții. Cei doi pigmenți pirolici, hemul și clorofila (ultimul având ca metal central magneziul) stau la baza proceselor vitale ale regnului animal și vegetal. Vitamina B_{12} are, în poziția sa centrală, tot un inel tetrapirolic cu rol în metabolismul ADN, iar metalul din centrul inelului tetrapirolic este cobaltul.

Hemul este un constituent celular prezent în toate celulele organismului cu rol în procesele de transport de oxigen sau de oxidoreducere tisulară. Biosinteza hemului este însă mai activă în două țesuturi: eritropoietic și hepatic. În măduva osoasă se produc zilnic circa 300 mg de hem, care este asociat cu globina, asigurând rația zilnică de hemoglobină. În ficat se produc zilnic circa 60 mg de hem pentru formarea de hemoproteine ca: *citocromii* A, B și C (din mitocondriile hepatice), *catalazele* și *peroxidazele* (din hepatosomi), *triptofanpirolaza* (din citosolul hepatic), *citocromul* P_{450} (de la nivelul reticulului endoplasmic) etc.

Majoritatea manifestărilor clinice au în comun fotosensibilitatea (cu excepția porfiriei acute intermitente), provocată de acumularea în țesu-

turi, implicit în piele, a unor produşi intermediari porfirinici care, excitaţi de razele ultraviolete cu lungime de undă lungă, desfăşoară o acţiune de liză a membranelor lizosomale şi mitocondriale din celule. Efectul distructiv se mai desfăşoară şi asupra sistemului nervos la 4 din cele 7 porfirii individualizate.

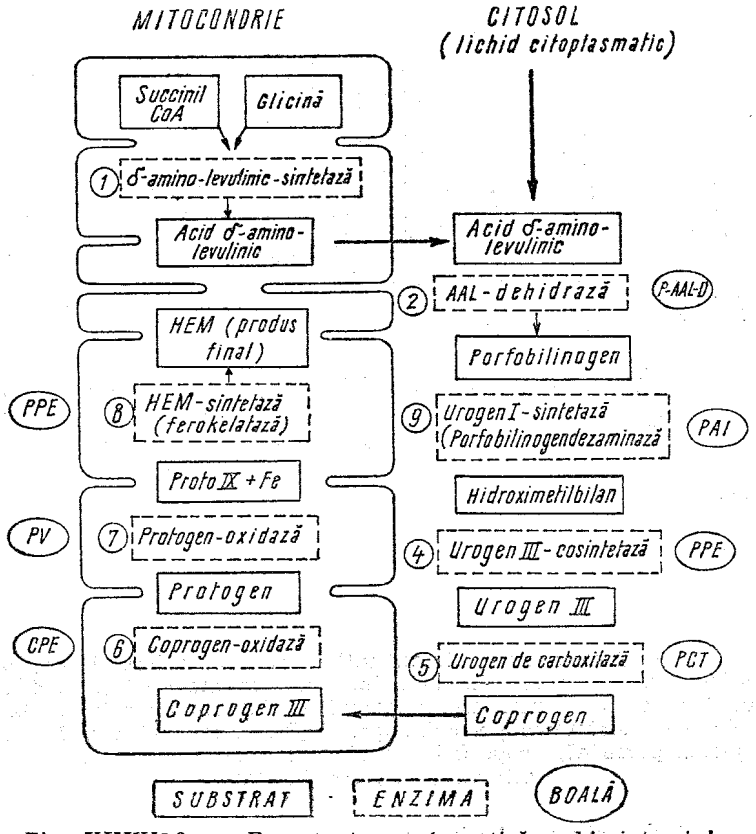


Fig. XXXVI.2. — Reprezentare schematică a biosintezei hemului. Hemul se sintetizează prin intermediul a 8 enzime, în două sisteme distincte: în mitocondrii (prima şi ultimele 3 faze) şi în citosol (enzimele 2, 3, 4 şi 5). În dreptul fiecărei enzime este trecută şi maladia ce rezultă din scăderea activităţii acesteia, cu excepţia enzimei nr. 1, enzimă ce iniţiază ciclul şi care nu este specific numai pentru sinteza hemului.

PORFIRII ERITROPOIETICE

PORFIRIA ERITROPOIETICĂ CONGENITALĂ (PEC) SAU BOALA GÜNTHER

Această porfirie predominantă la sexul masculin este cea mai gravă, dar şi cea mai rară din întregul grup cunoscut de porfirii (nu cu mult peste 100 de cazuri descrise în toată literatura medicală, printre care unele în ţara noastră) (8).

Boala a fost descrisă și la unele specii de animale: vite, porci, pisici, vulpi.

Patogenie. PEC se transmite autosomal recesiv. Heterozigoții nu prezintă manifestări clinice. Este produsă de un defect major al enzimei nr. 4, *uroporfirinogen III* sintetaza, care intervine în transformarea uroporfirinogenului de tip I în izomer de tip III, singurul care poate conduce la formarea hemului. Această caracteristică se menține atât în regnul animal, cât și în cel vegetal. Sinteza porfirinelor are un determinism genetic diferit pentru fiecare din cele două forme de izomerie. Izomerul I al porfirinei se găsește în mod normal doar ca urme în urină. Nu se știe de ce în natură răspândirea cea mai mare o au porfirinele de tip III; aceasta a apărut în regnul animal sau vegetal cu sute de milioane de ani în urmă și s-a menținut de-a lungul speciilor. În urma reducerii cu circa 2/3 a activității enzimei nr. 4, în boala Günther apar acumulări mari de uro- și coproporfirină I care se elimină, în cantități mari în urină și fecale. Această persistență la izomerul I este însă neenzimatică și, paradoxal, nu este însoțită de creșteri ale precursorilor porfirinici.

În măduva osoasă are loc totodată o producție crescută de uroporfirină III și de hem care se face pe socoteala acumulării în măduvă a unor cantități mari de hidroximetilbilan care este convertit neenzimatic în urobilinogen I. Splenomegalia ce se constituie consecutiv aportului crescut de eritrocite anormale ce conțin un exces de porfirine care le predispune la hemoliză, poate contribui la producerea anemiei și prin hipersplenism poate provoca leuco- și trombocitopenie.

Tablou clinic. PEC este, în general, de mare severitate și începe încă din prima copilărie și mai rar la vârsta școlară sau în adolescență. Uneori, după primele zile de la naștere, se constată că urina și meconiul nounăscuților pătează scutecele.

Suferința cea mai chinuitoare este, de departe, sensibilitatea extrem de pronunțată a pielii în zonele expuse la lumină *(fotodermatoză)*. Aceasta se manifestă exclusiv pe regiunile descoperite, mai ales în anotimpurile calde (*„hidroa-estivale"* a vechilor autori), dar poate apărea și la expuneri repetate la soare blând (toamna) sau la plimbări pe zăpadă și chiar la declanșările repetate ale „flash"-urilor fotografice. Fotosensibilitatea pare să fie dată de liza membranei lizosomilor celulari cu conținut bogat în enzime hidrolitice, cu formări de mediatori de tipul histaminei. Forma clinică completă de PEC, descrisă de Günther în 1911, este mai rară, dar caracteristică. Fotosensibilitatea se manifestă prin roșeață, edeme, vezicule și bule care se rup producând ulcerații și necroze sau se pot infecta. Vindecarea este lentă și lasă pigmentări, atrofii și cicatrice care, prin repetare în decursul anilor, pot duce la mutilări asemănătoare celor întâlnite în lepră (amputări de degete ș.a.). Înfățișarea bolnavilor devine desfigurată, în urma retracțiilor de la nivelul nasului, pleoapelor, urechilor, buzelor, sprâncenelor etc. Veziculele și bulele se pot extinde și la mucoasa bucală sau oculară, dând gingivite, conjunctivite, ulcerații corneene cu sechele grave care pot evolua până la cecitate. Modificări asemănătoare apar și la nivelul extremităților. Fotosensibilitatea se explică prin depuneri de porfirină în stratul bazal al epidermei. Hipertricoza și hirsutismul completează sindromul cutanat (oameni maimuță sau oameni cu înfățișarea leonică) care au inspirat și unele povestiri pentru copii.

Dinţii sunt de culoare gălbuie până la brun, iar la lumina ultravioletă emană o fluorescenţă roşie purpurie din cauza depozitării cristalelor de porfirină în dentină *(eritrodonţie)*. Acest fenomen poate fi observat şi la alte segmente ale scheletului, care poate suferi demineralizări importante. El se explică prin afinitatea porfirinelor pentru fosfatul de calciu din oase.

Fenomenele neurologice şi cele digestive lipsesc în PEC, iar drogurile (care au un rol atât de important în porfiriile hepatice) par să nu aibă nici un rol în expresia clinică. În schimb PEC este unica porfirie în care sunt întâlnite modificări hematologice (dar şi acestea de grade moderate), ca: anemie (predominant de tip hemolitic) şi splenomegalie (unul din puţinele semne viscerale ale bolii).

Excesul de porfirine în eritrocite le predispune la hemoliză.

Sindromul urinar este, alături de fotosensibilitate, la baza diagnosticului. Urinile prezintă o culoare roşie maronie, chiar neagră, care pătează lenjeria. În PEC se realizează eliminările urinare cele mai ridicate de porfirine. Producţia zilnică poate atinge, sau chiar depăşi, 500 mg de uro- şi coproporfirine; izomerul I este în proporţie de circa 90% (în condiţii fiziologice izomerul III este secretat în exclusivitate şi doar în cantităţi reduse). Absenţa excreţiei de precursori porfirinici, AAL şi PBG, care sunt în cantităţi normale, apare ca un fapt paradoxal. Fecalele conţin, de asemenea, cantităţi crescute de coproporfirine, predominant de tip I, precum şi cantităţi mai reduse de uroporfirină I şi II.

Eritrocitele şi eritroblaştii acumulează cantităţi importante de produşi porfirinici (200—800 µg/l masă eritrocitară), mai ales protoporfirină şi, cantităţi mai mici, de uro- şi coproporfirină. În lumina ultravioletă unele eritrocite sunt fluorescente (fluorocite), fapt ce poate fi observat şi în măduvă (normoblaşti şi reticulocite fluorescente). O hemoliză este aproape totdeauna prezentă.

Durata de viaţă a bolnavilor este adesea scăzută, datorită unor complicaţii infecţioase sau hematologice.

PROTOPORFIRIA ERITROPOIETICĂ EREDITARĂ

PPE este cunoscută şi sub denumirea de protoporfirie eritrohepatică deoarece manifestările cutanate tipice sunt însoţite frecvent de unele suferinţe hepatice. Ea este produsă de scăderea la aproximativ jumătate a ultimei enzime a ciclului porfirinic: ferochelataza. Împărţirea în porfirii eritropoietice şi hepatice a fost argumentată, printre altele, şi de fluorescenţa roşie a diferitelor ţesuturi. Astfel, în PEC fluorescenţa domină la nivelul măduvei, pe când în alte porfirii, fenomenul este localizat la ţesutul hepatic. În afara acestui răspuns monotisular, există şi porfirii în care acest fenomen este intricat fără să se poată demonstra cota parte ce revine fiecărui organ. Ferochelataza este deficitară în toate ţesuturile, dar în unele ţesuturi ea apare cu mai mare pregnanţă, ca: măduva hematoformatoare, ficat, fibroblaşti etc.

Incidenţă şi patogenie. PPE are o răspândire relativ rară, comparativ cu alte tipuri de porfirii, şi este caracterizată prin fotosensibilitate acută şi, adesea, prin afectare hepatică. Se descriu şi forme latente sau incom-

plete de boală față de forma comună. Boala afectează ambele sexe în mod egal. Întrucât părinții bolnavilor nu prezintă sensibilitate cutanată, persistă unele incertitudini în legătură cu modul de transmitere.

Protoporfirina se acumulează în eritroblaști încă înainte de expulzia nucleului. Fluorescența măduvei arată că cea mai mare parte a protoporfirinei se găsește în reticulocite. În PPE, protoporfirina este liberă în eritrocit nefiind legată de atomii de zinc, ca în intoxicațiile cu plumb sau ca în anemiile feriprive, ori în formele homozigote de porfirie. În ultimele două situații zinc-porfirina este legată de hemoglobina eritrocitară. Aceste moduri diferite de legare în eritrocit fac ca protoporfirina să se comporte diferit față de razele ultraviolete, imprimând protoporfirinelor din PPE capacitatea de a produce leziuni la expunerea tegumentelor la soare. Ficatul este și el o sursă importantă de protoporfirină în PPE, iar acumularea ei fiind insolubilă, are, în acest organ, tendința să formeze structuri cristaline în celulele hepatice și, implicit, afectarea lor funcțională (1).

Tablou clinic. Debutul PPE se situează încă în prima copilărie. Peste 70% din copiii bolnavi prezintă suferințe cutanate înainte de vârsta de 5 ani, rareori după 10 ani, dar, uneori, din primele săptămâni de viață. Manifestarea dominantă și caracteristică bolii este urticaria solară ce apare sub formă de puseuri acute la expunerea tegumentelor la lumină. Unii bolnavi reacționează mai mult prin roșeață și usturime (senzație de urzicare), cu durata de o oră sau câteva ore, alții prin edeme difuze însoțite de arsuri intense și apariția de mici vezicule, fenomene ce pot persista 24 de ore sau mai mult. Manifestările cutanate pot apărea la câteva minute după expunerea la soare. Rar, un prurit poate fi declanșat de lumina electrică, de căldura ambiantă sau chiar de traumatisme. Alți bolnavi reacționează și la lumina ce pătrunde în cameră prin geamurile închise, prin perdeaua subțire, sau chiar la plimbările sub cerul înnorat. Sunt descrise și forme severe asociate cu purpură și edeme însoțite de semne generale, ca stare de rău, agitație, frisoane, insomnii, care pot merge până la colaps. Aceste manifestări sunt mai puternice în lunile de primăvară-vară decât toamna. În urma puseurilor acute și repetate, în 80% din cazuri, pe locurile expuse la soare (nas, frunte, pometi, fața dorsală a mâinilor și degetelor) pot persista sechele permanente. Cel mai frecvent, aceste zone se asemănă cu coaja de mandarină sau de portocală. Când leziunile sunt mai pronunțate, se asociază și o hiperkeratoză cu cicatrice confluente. Frecvent pot fi întâlnite forme clinice latente sau incomplete, alături de forme severe veziculobuloase și hemoragice.

Fotosensibilitatea nu este, în toate cazurile, unicul simptom de suferință. Se constată, mai ales la femei, suferințe ale veziculei și căilor biliare și uneori litiază cu calculi bogați în protoporfirină. În citoplasma hepatocitelor se pot evidenția granule de protoporfirină (mai evidente la microscopul electronic). Se pot observa de asemenea colestază și fibroză periportală. Afectarea hepatică este produsă de cristalizarea protoporfirinei în ficat. În puține cazuri ea poate progresa rapid și duce la o insuficiență hepatică letală.

PPE este singura porfirie în care porfirinele și precursorii lor apar în limite normale în produșii de excreție.

Diagnosticul este confirmat de creşterea protoporfirinei eritrocitare până la valori, uneori considerabile, de peste 100 de ori faţă de normal (500—5 000 μg/100 g masă eritrocitară, faţă de normal < 50 μg/60 g). În anemiile hipocrome feriprive şi mai ales în intoxicaţiile cu plumb, protoporfirinele eritrocitare prezintă, de asemenea, creşteri importante (100—500 μg/100 g şi chiar mai mult), în afara oricărei simptomatologii cutanate. La anemicii cu deficit de fier, protoporfirina se acumulează în eritrocite din cauză că lipseşte fierul cu care ar trebui să se unească pentru a produce hem. Proba fluorometrică a eritrocitelor proaspete este fidelă şi poate fi folosită ca probă de triere în masă. Cele mai mari creşteri ale protoporfirinelor eritrocitare sunt întâlnite în saturnism. Coproporfirina eritrocitară poate prezenta periodic creşteri de 50—1 500 μg.

Frotiul sanguin, examinat la microscopul cu fluorescenţă, arată că 10—50% din eritrocite reflectă o fluorescenţă superficială roz-portocalie (fluorocite), proprie eritrocitelor tinere care au conţinut suficient de protoporfirină. Protoporfirina în exces se găseşte şi în plasmă, bilă şi fecale, când boala este simptomatică.

Tratamentul porfiriilor eritropoietice şi eritrohepatice (PEC şi PEP) rămâne încă nesatisfăcător. Evitarea expunerilor la soare trebuie respectată cu stricteţe. Agenţii locali, aplicaţi pentru protejarea pielii, au o valoare redusă. De aceea, în caz de necesitate, bolnavii vor purta mănuşi, ciorapi, pantaloni lungi, umbrele de soare etc., şi vor evita expunerile şi plimbările când soarele este arzător. Evitarea traumatismelor cutanate şi tratamentul imediat al infecţiilor contribuie la prevenirea cicatricelor deformante şi a mutilărilor.

Tratamentul cu carotenoizi (morcovi) în doze mari, pe durată lungă, este răspândit ca agent fotoprotector, dar cu efecte îndoielnice; în plus, are şi neajunsul că îngălbăneşte pielea pacientului. Preparatele pure de β-caroten elimină coloraţia pielii pacienţilor. Doze de 100—200 mg pe zi asigură o concentraţie sanguină de 500—800 μg%.

Colestiramina poate reduce concentrarea de protoporfirină, întrerupându-i circuitul enterohepatic. Au mai fost folosite, uneori cu efecte benefice, transfuzii cu hematină pentru a suprima producţia de protoporfirină în reticulocite şi în ficat, corectarea deficitului de fier, splenectomia. Au fost comunicate şi câteva cazuri cu transplant hepatic care uneori ne poate pune la adăpost de complicaţii hepatice ulterioare.

Tratamentul simptomatic trebuie individualizat. În PEP atenţia trebuie îndreptată în direcţia afectării hepatice, iar în PEC în direcţia sindromului anemic.

PORFIRIILE HEPATICE

Porfiriile hepatice se manifestă clinic prin două moduri: acut şi cronic.

PORFIRII HEPATICE ACUTE

PORFIRIA ACUTĂ INTERMITENTĂ (PAI)

După cum o indică însăşi denumirea, boala apare în accese periodice (cu caracter acut), pe un fond de sănătate aparentă, deşi boala este cronică şi ereditară.

Incidență. Dintre toate tipurile de porfirie (eritropoietică și hepatică), această formă urmează, ca frecvență, în țara noastră, porfiriei cutanate tardive. Dar lipsind fotosensibilitatea, diagnosticul este adesea confundat cu formele medicale sau chirurgicale ale abdomenului acut sau cu unele afecțiuni neuropsihice, mai ales când semnul revelator al bolii, culoarea urinii, trece nesesizat. În țările nord-europene prevalența bolii este evaluată în jur de 5 la 100 000 de persoane. Boala se observă, în general, la adulții tineri (20—30 de ani), fiind extrem de rară sub 15 ani sau peste 60 de ani. Incidența este mai ridicată la femei decât la bărbați (7 : 3 din cazuri sau chiar mai mult).

Patogenie. Defectul enzimatic rezidă în scăderea cu circa 50% a activității enzimei nr. 3 de sinteză a hemului: uroporfirinogen-1 sintetaza sau porfo-bilinogen dezaminaza, motiv pentru care PAI a fost numită și piroloporfirie. Frecvent se poate constata caracterul familial al tarei prin manifestări clinice; pentru depistarea purtătorilor de tară, este însă necesară dozarea PBG dezaminazei în eritrocite și a coproporfirinogen oxidazei și a protoporfirinogen oxidazei în limfocite. Scăderea PBG a fost găsită în toate țesuturile, dar ea poate fi cel mai bine demonstrată în eritrocite. S-au găsit, până în prezent, 4 tipuri de mutanți ai PBG dezaminazei ceea ce explică și diferențele în expresivitatea clinică a bolii. Deficitul de PBG dezaminază induce însă creșterea AAL sintetazei cu scopul de a realiza un surplus de substrat pentru enzima deficitară și de a asigura o rată suficientă de hem pentru organism (1).

Toate manifestările clinice din atacul acut al porfiriilor hepatice — fie că sunt neurologice, psihice sau vegetative, fie că sunt sub formă de colici abdominale, constipație, tahicardie sau hipertensiune, au ca substrat leziuni ale nervilor sub formă de axonopatie, cu pierderi de fibre mielinizate sau degenerescență axonomielinică. Patogenia exactă a leziunilor nervoase rămâne însă necunoscută, deși au fost exprimate mai multe ipoteze pentru explicarea acestor tulburări majore neurologice. PAI, porfiria *variegata*, coproporfiria ereditară, porfiria AAL-D și saturnismul sunt asociate cu creșteri ale AAL și cu manifestări neurologice asemănătoare, ceea ce sugerează că AAL ar avea rolul neuropatic principal. AAL poate fi convertit în țesuturi în PBG și porfirine, iar PBG poate forma și alte tipuri de monopiroli, el putând străbate mai ușor bariera neurosanguină decât AAL. Alte ipoteze au fost de asemenea postulate, dar nici una nu explică convingător cauza alterărilor neurologice.

AAL posedă o structură analogă cu acidul γ-aminobutiric (GABA) și poate interacționa cu receptorii GABA.

Tablou clinic. La purtătorii de tară pot fi întâlnite emisiuni sporadice de urini hipercrome, fenomene dureroase abdominale sau fenomene neuropsihice, fără să se bănuiască substratul patogen. Factorii declanșatori sau favorizanți de crize pot fi adeseori stabiliți, dar marea majoritate a subiecților rămân clinic asimptomatici toată viața.

Cu toate că boala se manifestă polimorf, semiologia clasică descrie o triadă de manifestări clinice: abdominale (90%), neurologice (50%) și psihice (85%) în afara sindromului urinar (întâlnit în 100% din cazuri). Aceste manifestări clinice pot fi întâlnite simultan, izolat sau succesiv (fig. XXXVI.3). A fost descris și un caz de o severitate extremă la un copil care a moștenit tara de la ambii părinți (1).

Absența sindromului cutanat duce rareori la stabilirea corectă a diagnosticului de la începutul manifestărilor clinice. Mai grav este faptul că necunoașterea diagnosticului duce la aplicarea frecventă a unor terapii neadecvate (administrări de barbiturice, intervenții chirurgicale etc.). Dacă bunul obicei al vechilor clinicieni de a examina macroscopic urina emisă s-ar păstra și dacă și sindromul porfirinic ar intra în formula gândirii medicului aflat în fața unor astfel de tablouri clinice, s-ar contribui mai mult la apărarea bolnavului față de unele riscuri terapeutice.

a) *Sindromul abdominal* se manifestă, în principal, printr-o triadă semiologică caracteristică: dureri, vomă și constipație.

Durerile abdominale sunt prezente în peste 90% din cazuri, fără însă să aibă nimic comun cu vreun substrat abdominal real. Această simptomatologie înșelătoare explică frecventele erori de diagnostic care culminează cu falsul abdomen acut chirurgical sau cu altă localizare (pelvină, renală). Durerea este de intensitate variabilă. Frecvența durerilor discrete este incontestabil mai ridicată, de aceea nu i se acordă importanță diagnostică. Numeroși pacienți prezintă însă dureri persistente, adeseori cu caracter de colică, fără un substrat lezional caracteristic. Durerile îmbracă, uneori, aspectul unei „drame abdominale" și duc la diagnostice false ca: apendicită acută, litiază biliară, ulcer perforat, ocluzie intestinală, pancreatită acută, infarct mezenteric, litiază renală,

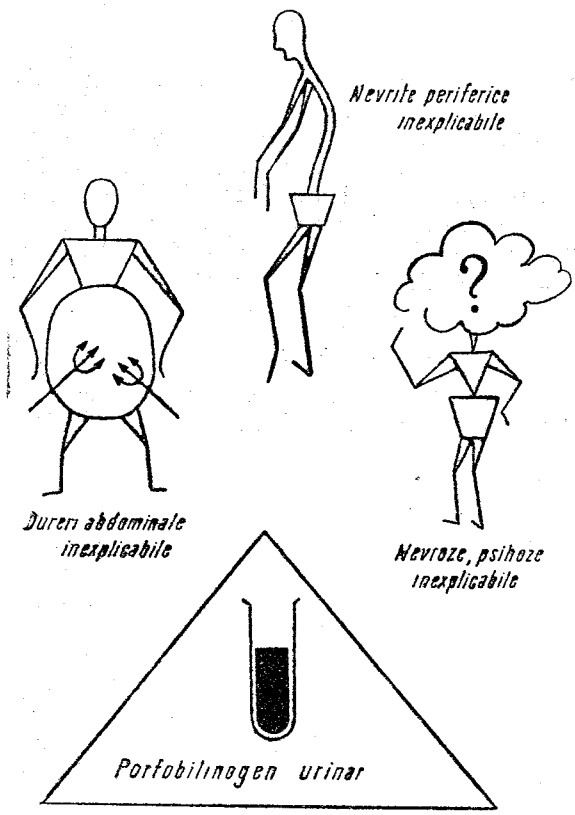


Fig. XXXVI.3. — Ilustrare sugestivă simplificată a sindroamelor: abdominal, neuropsihic și urinar în porfiria acută intermitentă (după Brodie și Goldberg, 1986).

sarcină extrauterină etc., soldate cu intervenţii şi reintervenţii chirurgicale inutile, unele cu sfârşit letal. Watson citează cazul unei bolnave de 29 de ani care a fost supusă la 10 laparotomii inutile în decurs de 8 ani. Sediul durerilor este variabil; ele pot fi localizate în orice cadran abdominal şi pot să iradieze în orice sector (coloană, umăr, coapse etc.). Localizarea şi modul de manifestare a durerilor apar, remarcabil de constant, cu ocazia crizelor la acelaşi pacient. Durerile nu sunt însoţite decât rar de alte fenomene, ca apărare musculară, leucocitoză, febră etc. întrucât simptomele sunt de natură neurologică şi nu inflamatorie. Uneori există discrepanţe izbitoare între acuzele bolnavului şi absenţa fenomenelor locale sau comportamentul bizar al bolnavului în cursul crizelor, ducând uneori la suspiciunea unui diagnostic de simulare sau de isterie.

Vărsăturile, asociate de obicei colicilor, pot avea uneori un caracter incoercibil, cu pericol de a produce un dezechilibru electrolitic. Hiponatremia poate duce la secreţii insuficiente de hormon antidiuretic.

Constipaţia este de obicei tenace şi se însoţeşte de meteorism; când acestea sunt foarte intense pot realiza un tablou de falsă ocluzie intestinală. Ileusul dinamic cu distensie şi scăderea zgomotelor intestinale este frecvent. Deşi constipaţia, prin frecvenţa şi intensitatea ei, pledează în favoarea diagnosticului de porfirie, în circa 10% din cazuri, au fost întâlnite diarei care în rare cazuri sunt de culoare roşie, simulând o rectoragie.

b) *Sindromul neuropsihic.* Complicaţiile neuropsihice sunt deseori inaugurale şi revelatoare ale viciului metabolic, până atunci latent. Ele sunt adesea precedate de manifestări nespecifice, ca iritabilitate extremă, insomnii, cefalee, senzaţie de slăbiciune în membre, parestezii, dureri musculare generalizate sau crampe, adeseori dureri de tip polinevritic. Neuropatia periferică, când apare, este de tip motor şi se datoreşte unei degenerări axonice.

Dintre complicaţiile neurologice, paralizia flască simetrică, de cele mai multe ori de tip periferic, este cea mai frecventă. Intensitatea acesteia este variabilă, de la simplă pareză, până la abolirea completă a forţei musculare. Atingerea motorie se însoţeşte de areflexie tendinoasă. Paralizia poate fi extensivă şi poate duce, în câteva zile, la instalarea unei tetraplegii complete. Alteori, poate fi cuprinsă şi musculatura abdominală, a trunchiului, a diafragmului şi a muşchilor intercostali cu paralizie respiratorie. Această evoluţie posibilă impune supravegherea maximă a bolnavului pentru a nu pierde momentul dirijării sale spre un serviciu de respiraţie asistată.

Atrofiile musculare însoţesc paraliziile şi pot ajunge până la o adevărată „topire" a musculaturii din teritoriul neuronilor motori respectivi; acest aspect impune diferenţierea de paralizia saturnină cu care se aseamănă uneori.

Atingerea nervilor cranieni (facial, oculomotor etc.) este întâlnită în circa 10% din cazuri. Rareori sunt afectaţi nervul optic sau lobii occipitali, când poate apărea orbirea. Şi mai rară este afectarea bulbară care se poate solda cu moartea rapidă prin paralizia centrală a respiraţiei şi sincopă cardiacă. Au fost descrise şi afectări ale cerebelului sau ale ganglionilor bazali şi, de asemenea, retenţia urinară.

Crizele comițiale se întâlnesc relativ frecvent; adesea sindromul neurologic debutează sau se complică cu astfel de manifestări care, tratate cu barbiturice, agravează evoluția bolii.

După o evoluție de câteva săptămâni, fenomenele neurologice retrocedează fără să lase urme. În rare cazuri însă, se pot instala și sechele pe termen lung, ca de exemplu tetrapareză sau hipertensiune arterială.

Complicații psihice însoțesc sindromul neurologic și pe cel abdominal, dar apar rareori ca singure manifestări. Ele se traduc prin insomnii, labilitate psihică exagerată, stare anxioasă, stări depresive, dezorientări, halucinații, stări paranoice și tulburări de comportament. În unele cazuri au fost descrise tentative de divorț sau cazuri de desfacere a contractului de muncă; dar în majoritatea cazurilor, asemenea acte nu ajung să fie finalizate, datorită unei evoluții regresive totale. În asemenea situații, au fost frecvent formulate diagnostice de tiroidie sau isterie. Sunt citate cazuri de tiroidectomie fără nici o tulburare a funcției acestei glande. Nimfomania este frecventă în cursul acestor atacuri, în timp ce adevăratele psihoze sunt cu totul rare.

c) *Distonia neurovegetativă* cu implicații mai ales cardiovasculare este întâlnită în circa 70% din cazuri. Cea mai frecventă este tahicardia sinusală cu alură ventriculară de peste 160/min, legată de hipertonia simpatică. Hipertensiunea arterială tranzitorie este frecvent întâlnită; cea persistentă este considerată sechelă după astfel de atacuri. Hipotensiunea, adesea posturală, cu sincopă, a fost uneori observată, mai ales în cursul evoluției spre vindecare. Hipertonia vagală se manifestă mai rar și se traduce prin bradicardie, mergând până la colaps.

d) *Sindromul urinar*, în perioadele de criză, se caracterizează, macroscopic, prin urini închise la culoare, imitând vinul roșu. Alteori urinile pot fi normal colorate la emisie, dar se închid la lumina zilei sau prin trecerea timpului. Uneori apar disurie și disfuncție vezicală care necesită cateterism. Biochimic, caracteristica principală este creșterea considerabilă în urină a precursorilor porfirinei (PBG și AAL) (normal 0—7 mg în 24 de ore), precum și o creștere importantă a uroporfirinei (URO). Excreția excesivă de PBG este elementul cel mai caracteristic dintre produșii de sinteză ai porfirinei. În PAI, eliminarea de PBG este în medie de 100 mg/24 h (cu variații de la 10 la 200 mg și chiar mai mult). În cursul remisiunilor, excreția se reduce la 10—50 mg/24 h și, mult mai rar, ea atinge valori normale.

O metodă calitativă folosită frecvent și la îndemâna unui laborator de biochimie cu dotare medie, este testul Watson-Schwartz pentru PBG. El se face cu ajutorul reacției Ehrlich modificată. La 2,5 ml urină inițial alcalinizată la pH 7—8, se adaugă 2,5 ml reactiv Ehrlich și 2,5 ml HCl, iar după 1—2 minute, 5 ml soluție saturată de acetat de sodiu și 5 ml cloroform; se agită până la apariția culorii roșii: dacă ea nu apare, se mai adaugă 5 ml butanol.

În cursul crizei se poate instala uneori o hiponatremie ce poate avea diverse cauze: afectarea hipotalamusului cu tulburarea secreției de hormon antidiuretic, vărsături, diaree ș.a.

Evoluție și prognostic. Evoluția bolii este variabilă. După declanșare pot apărea, la intervale variabile, alte crize neprevizibile care la un același pacient au adesea același aspect. Au fost descrise cazuri de deces

chiar cu ocazia primei crize. În general, simptomele neuromusculare şi psihice sunt manifestări tardive, iar apariţia lor exprimă un prognostic mai sever. Unii bolnavi pot rămânea cu uşoare infirmităţi fizice sau de comportament. De cele mai multe ori se obţine o restituţie completă, atât fizică cât şi psihică, deşi vindecarea poate fi uneori lentă. De menţionat că nu există un paralelism strict între intensitatea manifestărilor clinice şi semnele de laborator, respectiv cantitatea de metaboliţi excretaţi. În cursul perioadelor de latenţă, eliminarea uro- şi coproporfirinelor şi chiar a precursorilor porfirinei (PBG şi AAL) poate fi normală, ceea ce reprezintă o trăsătură specifică şi caracteristică a PAI.

Diagnosticul PAI în afara crizelor este dificil datorită simptomelor uneori nespecifice şi semnelor fizice reduse. În cazul unei suspiciuni, testul Watson-Schwartz poate oferi unele indicaţii, dar el poate da rezultate fals pozitive şi este mai puţin sensibil decât metodele cantitative. Determinarea PBG dezaminazei în eritrocite poate fi utilă pentru confirmarea diagnosticului, deşi este grevată de unele inconveniente: limita largă, până la de 3 ori a valorilor normale, creşterea ei şi în anemii hemolitice şi existenţa de cazuri de PAI cu deficitul enzimei numai tisular, nu şi eritrocitar. Determinarea enzimei este însă de mare folos în examinarea *pedigree*-ului unui bolnav cu PAI.

PORFIRIA VARIEGATA (PV)

PV se caracterizează prin gruparea tuturor semnelor de boală ce caracterizează celelalte porfirii hepatice, izolat sau în totalitate şi într-o ordine variabilă, rareori concomitentă, ceea ce face ca şi diagnosticul unui anumit tip de porfirie să varieze în decursul evoluţiei în funcţie de sindromul manifestat: porfiria cutanată tardivă (dacă este prezent sindromul cutanat), porfiria acută intermitentă (când sindromul cutanat lipseşte) şi coproporfiria ereditară unde poate, de asemenea, să existe întreaga triadă, fără a vorbi despre diferite diagnostice eronate neporfirinice. De aceea PV este descrisă şi ca porfirie mixtă sau *variegata* (cuv. lat = variat, felurit, pestriţ). Ca şi în alte porfirii genetice, în PV există o foarte mare variabilitate în expresia clinică. Prezenţa tuturor sindroamelor (abdominal, neuropsihic şi cutanat) în cursul vieţii unui astfel de bolnav nu este obligatorie. Nu este cazul să se repete prezentarea sindromului abdominal şi neuropsihic (descrise la PAI) şi nici a celui cutanat descris la porfiria cutanată tardivă.

Răspândirea pe sexe este aproximativ egală, dar manifestările cutanate sunt mai frecvente la bărbaţi decât la femei, pe când sindromul digestiv şi cel neurologic motor au o frecvenţă egală. Manifestările psihice sunt mai des întâlnite la femei şi pot debuta în cursul sau la scurt timp după pubertate (cazuri personale, 23). Au fost descrise uneori la acelaşi individ, atât porfiria *variegata*, cât şi cea cutanată tardivă (porfirie dublă) (1).

Pentru a fi identificată faţă de alte tipuri de porfirii hepatice, atât faţă de cele cu manifestări acute, cât şi de cele cu manifestări exclusiv cutanate, este necesară cunoaşterea specificităţii biochimice. Există o strânsă asociere între protoporfirinogen oxidaza din interiorul membranei mitocondriale (din criste) şi coproporfirinogen oxidaza din intermem-

brană, ceea ce explică și excesul de excreție, atât a protoporfirinei, cât și a coproporfirinei în această boală. Pentru punerea diagnosticului de PV este necesară găsirea unor cantități crescute de protoporfirine în scaun. Un test rapid de evidențiere este amestecul fecalelor cu un amestec de părți egale de alcool amilic cu acid acetic glacial și eter. Solventul este agitat, iar soluția este examinată la lumina ultravioletă, folosindu-se filtre Wood. Un rezultat fals pozitiv poate să apară și în afară de PV, deși acest test este considerat ca unul util și rapid în diagnosticul de triere a acestei boli.

COPROPORFIRIA EREDITARĂ (CPE)

CPE este tot o porfirie de tip hepatic, dar mai rară ca frecvență decât PAI și PV, în care activitatea enzimatică a enzimei nr. 6 (coproporfirin oxidaza) este scăzută la circa 50% față de normal. Se transmite autosomal dominant, dar au fost descrise și cazuri homozigote apărute la o vârstă mai timpurie, cu manifestări clinice severe și în care activitatea enzimatică a fost profund scăzută. Gena mutantă este localizată pe cromosomul 9. Sunt însă observații care sugerează că ar exista cel puțin două tipuri de mutații ce produc anomalii cu manifestări diferite ale maladiei. Activitatea enzimatică a fost găsită normală la nivelul ficatului. Excesul de AAL și PBG în cursul crizelor de atac se explică prin inducția AAL sintetazei de către drogurile și hormonii care le induc și în alte porfirii hepatice în care se semnalează astfel de crize.

Tabloul clinic se aseamănă cu cel al porfiriei *variegata* (sindrom cutanat, abdominal și neuropsihic), fără să fie nici aici obligatorie prezența concomitentă a triadei amintite; intensitatea manifestărilor pare să nu fie însă, în CPE, tot atât de dramatică. Manifestările clinice sunt latente înainte de pubertate, iar apariția ei este mai frecventă la femeie decât la bărbat (1, 13).

Semnele de laborator se caracterizează printr-o excreție crescută a coproporfirinelor în urină și în scaun. În cursul acutizării se remarcă și creșteri ale AAL, PBG și uroporfirinei. Dozarea nivelului de porfirine în fecale este un test util de triere a tarei în familiile în care au fost găsite cazuri patente.

Tratamentul este similar cu cel din PAI și PV. Flebotomiile și clorochina sunt fără efect în CPE.

PORFIRIA PRIN DEFICIT DE AAL DEHIDRAZĂ

Este cea mai recent descoperită porfirie ereditară. Până în prezent au fost descrise doar trei cazuri (în 1970, 1980 și 1987), toate fără nici o legătură între ele. Debutul poate fi localizat în copilărie sugerând că dezvoltarea postpubertară ar fi mai puțin importantă decât în PAI, fiind prezente durerile abdominale și neuropatia. Nu au fost incriminate medicamente în declanșarea bolii. Ambii părinți prezentau, în cele trei cazuri studiate, o activitate scăzută a AAL-dehidrazei, ceea ce indică transmiterea recesivă a tarelor. Se constată excreție urinară de AAL și coproporfirină și reducerea activității enzimatice a AAL dehidrazei

în eritrocite. Același deficit enzimatic (enzima nr. 2) se constată și în intoxicațiile cu plumb unde apar, de asemenea, colici abdominale, ileus, neuropatie motorie și absența fotosensibilității. Gena pentru AAL-D este localizată pe cromosomul 9 (1).

PROFILAXIA ȘI TRATAMENTUL PORFIRIILOR ACUTE HEPATICE

Atâta timp cât nu există un tratament cauzal al porfiriilor, terapia preventivă și cea simptomatică sunt singurele în măsură să amelioreze suferințele și prognosticul neprevizibil.

Profilaxie. Măsurile profilactice sunt numeroase.

1) *Depistarea purtătorilor asimptomatici.* Este important ca după descoperirea unui caz de porfirie să fie investigate rudele de sânge pentru a se putea lua precauțiile necesare de a nu repeta filiera, adeseori eronată, uneori cu grave prejudicii, pe care o parcurg acești bolnavi până la stabilirea diagnosticului. Este cunoscut faptul că, în afara crizelor, eliminarea porfirinelor urinare și a precursorilor se normalizează. Laboratoarele dotate vor confirma diagnosticul și tipul de porfirie la purtători prin dozarea activității enzimatice din eritrocite pentru enzimele care acționează în citosol (PAI, PEC și PC familială) și în limfocite pentru enzimele mitocondriale (CH, PV și PPE).

2) *Protecția bolnavilor depistați împotriva unor atitudini agravante.* Este de dorit înscrierea tarei în buletinele de identitate (la pagina unde este trecut și grupul sanguin) sau pe o cartotecă anexă, în carnetul de sănătate sau pe un alt document la purtător, ușor accesibil, prin care medicii să fie avizați de existența tarei. Acești bolnavi trebuie să fie protejați în împrejurări în care devin simptomatici și nu sunt în măsură să dea lămuriri despre boala lor, situație în care trebuie adoptată o atitudine terapeutică specială. Prin natura lor, porfiriile fiind boli cu manifestări heterogene, un diagnostic eronat poate aduce prejudicii mai ales printr-o aplicare terapeutică inadecvată. Fiecare bolnav cu porfirie hepatică (cu caracter acut) are un potențial de a face o formă acută dintre cele mai grave și de a ajunge și la un alt medic care, dacă nu va fi avertizat, va putea să-i agraveze boala prin prescripții contraindicate sau eronate (exemplu: prescriere de barbiturice, recomandare de laparotomii inutile etc.). Bolnavii și famila lor, indiferent de nivelul lor cultural, trebuie să cunoască simptomatologia, având și datoria de a informa orice alt medic care nu le cunoaște boala. În cazul bolnavilor porfirinici, cu manifestări psihice bizare, pe parcursul crizelor se va atrage atenția anturajului asupra comportării neadecvate, dar tranzitorii, atât în familie, cât și la locul de muncă.

3) *Întreruperea sarcinii,* la cererea personală sau a familiei, trebuie favorizată. În afara laturii perpetuării stării morbide, poate fi pusă în pericol însăși viața pacientei.

4) *Conduita de viață.* Porfiriile făcând parte dintr-o tulburare metabolică de obicei înnăscută, organismul va fi ajutat să reziste la procesele de dismetabolism prin care este nevoit să treacă. Respectarea unei conduite de viață igienică, ordonată, cu sporirea orelor de somn, evitarea eforturile și a suprasolicitărilor nervoase, un regim alimentar zilnic bogat în hidrați de carbon (200 g) și proteine (100 g), evitarea noxelor pro-

fesionale etc., influenţează favorabil evoluţia bolii. Consumul de alcool este total contraindicat. În declanşarea crizelor sunt incriminate adesea şi regimul forţat de slăbire sau subalimentaţia care induce hiposecreţia de ALA sintetază, precum şi infecţiile intercurente, intervenţiile chirurgicale mari ş.a. Ovariectomia este contraindicată.

5) *Evitarea unor droguri* incriminate în declanşarea crizelor. În porfiriile hepatice acute este mult mai important de ştiut ce să nu se administreze bolnavilor decât medicaţia ce trebuie administrată. Administrarea anumitor medicamente poate declanşa puseuri de boală; de aceea, aceste medicamente trebuie cunoscute de bolnavi, de aparţinători şi de anturaj. Medicamentele incriminate în declanşarea unor accese sunt numeroase şi cu structuri chimice foarte diverse. În tabelul 36.II sunt prezentate principalele medicamente potenţial nocive şi interzise şi cele permise.

Pentru prevenirea acceselor frecvente (mai ales a celor ciclice) au fost propuse de unii autori administrări de analogi de hormon liberator de gonadotrofină sau perfuzii periodice cu hem.

Tratamentul în puseurile de acutizare implică competenţă şi responsabilitate. Evoluţia crizelor fiind imprevizibilă, orice bolnav de porfirie în criză de acutizare este un candidat la manifestări severe şi trebuie să fie spitalizat pentru a putea fi supravegheat şi a se putea interveni la timp în situaţii grave. Numeroşi bolnavi au fost pierduţi până la aplicarea protezării respiratorii. Întrucât respiraţia asistată nu este realizabilă decât în centre de reanimare bine dotate, bolnavii vor fi îndrumaţi din timp spre astfel de unităţi, mai ales când sunt prezente semnele neurologice, inclusiv durerile abdominale.

„Efectul glucoză" pare să fie, în prezent, tratamentul medicamentos cel mai bine tolerat şi mai la îndemâna oricărui serviciu. El constă în aport glucidic important asociat atât pe cale bucală, cât şi i.v., cel puţin 2×500 ml soluţie 10—20%, de două ori pe zi. Doza optimă recomandată este de cel puţin 300 g pe zi. Pentru a putea fi mai bine tolerate, acestor doze li se adaugă mici cantităţi de insulină (5—10 U/500 ml). Pe cale bucală se administrează sucuri naturale de fructe îndulcite sau compoturi, până la 1—2 l. Glucoza şi zaharoza *per os* sunt uneori mai greu tolerate şi pot contribui la distensie intestinală şi ileus.

Supravegherea volumului urinar în 24 de ore este necesară pentru a adapta aportul de lichide la necesităţi.

Acidul aspartic (Aspatfort) poate fi adăugat perfuziilor de glucoză, în proporţie de 1—2 fiole la fiecare pungă (500 ml).

Catabolismul azotat fiind intens, pierderea ponderală poate depăşi adesea 20% din greutatea iniţială şi de aceea este necesară alimentaţia pe cale orală sau artificială. Denutriţia (ca şi curele de slăbire) sunt răspunzătoare pentru declanşarea crizelor. Un conţinut scăzut în calorii, chiar şi pentru o perioadă scurtă, contribuie nu numai la menţinerea crizelor ci şi la declanşarea lor prin excreţia urinară de AAL şi PBG. Hidraţii de carbon au efect benefic nu numai în creşterea nivelului de AAL sintetază (care reprezintă doar un efect secundar) ci, în primul rând prin sinteza citocromului P_{450} la nivelul ficatului (1).

Corectarea balanţei hidroelectrolitice este importantă mai ales la bolnavii cu pierderi hidrice prin vărsături, diaree, hipersudaţie (de ori-

TABELUL 36.II

Lista medicamentelor interzise și a celor admise la bolnavii cu porfiria acută intermitentă, porfiria variegata și coproporfiria ereditară
(modificat după Smith și Maties)

Interzise	Permise	Interzise	Permise
1	2	3	4
Anestezice i.v.		*Stimulante ale SNC și psihoanaleptice*	
— barbiturice (penthotal)	— propanidid (epontal)	— imipramin și derivații	
— hidroxidion	— ketamin?	— iproniazid	
— etomidat?		— bemegrid	
		— teofilin	
Anestezice gazoase			
— halotan (narcotan)	— eter	*Antispasmodice*	
— cloroform	— ciclopropan	— toți produșii conținând noramidopirin (novalgin, analgin, noraminofluazon)	— atropina și derivații de beladonă
	— oxizi nitroși		
Anestezice centrale			
— pentazocin (fortral)	— morfin		
	— petidin		
	— dextromoramid		
	— fenoperidin		
	— fentanil (sublimaze)	*Anticolinergice*	
	— metadon		— neostigmin (miostin)
	— buprenorfin		
		Antihipertensive și diuretice	
		— tiazidice? (diamox, fonurit, ufrix, nefrix)	— propranolol
			— guanetidin (ismelin)
			— reserpin
		— spironolactonă?	— diazoxid
		— metil-dopa	
Anestezice locale		— hidralazin	
— lidocain (xilina și derivate)	— procain (novocain)		
Antipiretice — anestezice antiinflamatoare			
— amidopirin	— aspirin		
— antipirin	— dextropropoxifen		
— mefinizin	— paracetamol		
— fenacetin	— dihidrocodein		
— chinină	— clorochin		
— chinidină și antipaludice de sinteză	— indometacin		
— fenilbutazonă			
Miorelaxante		*Hipoglicemiante*	
— pancuroniu	— D-tubocurarin	— tolbutamid	— insulină
	— galamin	— clorpropamid	— biguanide (meguan)
	— succinilcolin		
Anticonvulsivante		*Hormoni și derivați*	
— barbiturice	— bromuri	— estrogeni	— glucocorticoizi
— hidantoin (fenitoin)	— clonazepam?	— androgeni	— ACTH
	— cloretiazol		

TABELUL 36.II *(continuare)*

1	2	3	4
— etosuccinid — trimetadion — primidon (mysolin) — carbamezepin (finlepsin, tegretol, stazepin) — valproat de Na?		— contraceptive orale	
Hipnotice anxilotice şi neuroleptice — *barbituricele (toate)* (ciclobarbital, fenobarbital, dormital, extraveral, fasconal, pasinal etc.) — meprobamat — *diazepam (valium)* — hidroxizin (atarax)? — librium (napoton) — glutetimid	— *clorpromazin* (largactil, plegomazin) — levomepromazin (nozinan) — oxazepam — bromuri — prometazin — valproat de Na? — haloperidol? — droperidol	*Antibiotice, sulfamide şi antiparazitare* — *grizeofulvin* — cloramfenicol — eritromicin — izoniazidă (rimifon) — rifamicin (rifadin) — toate sulfamidele — tinidazol (fasigyn)	— toate celelalte
		Diverse — citostaticele — derivaţi de secară cornută (ergomet) — probenecid (benemid) — alcool	— digitalin — diurocard — clofibrat (atromid) — vitaminele B — vitamina C

gine neurovegetativă). A fost descris şi un sindrom de secreţie a hormonului antidiuretic, răspunzător de hiperhidratare cu hiponatremie.

Tratamentul în cursul atacului este adesea problematic din cauză că toate medicamentele (în grade variabile) cu excepţia bromurilor, au un potenţial de exacerbare a crizelor. Totuşi clorpromazina pare mai puţin excitantă. De aceea durerile, stările anxioase şi insomniile pot fi combătute cu levomepromazin, clorpromazin, clordelazin (Largactil, Plegomazin), diazepam, oxazepam, cloralhidrat şi, la nevoie, morfină, petidin.

Tahicardia şi hipertensiunea vor fi combătute cu clorpromazin (Clordelazin, Largactil, Plegomazin) şi cu blocanţi ß-adrenergici (propranolol). Constipaţia rebelă, care însoţeşte criza de porfire, va fi combătută cu Neceţigmin.

În cazurile de amiotrofii sau paralizii care impun o imobilizare de lungă durată la pat, este de preferat o saltea fluidizată pentru combaterea escarelor, ca şi un tratament antibiotic adecvat pentru a combate complicaţiile bacteriene pulmonare. Pentru efectuarea de mobilizări mus-

culare pasive, precum și pentru supravegherea mersului bolii (în cazurile în care bolnavii nu necesită supravegherea în serviciu de terapie intensivă), este de preferat o persoană ca însoțitor permanent atâta timp cât bolnavul nu se poate ajuta încă singur.

Adenozin-monofosfatul (comercializat sub denumiri diferite ca Miostón), folosit pe scară largă în urmă cu circa un deceniu, a încetat să mai fie administrat.

Hematina, izomer al hemului, produsă din masă eritrocitară, este o achiziție relativ recentă în ceea ce privește tratamentul crizelor de porfirie. Ea acționează prin represia activității AAL sintetazei și prin diminuarea sintezei produșilor porfirinici. Ea se administrează în perfuzii i.v. Fiind instabilă în soluție neutră, pH-ul trebuie ridicat la 8 sau chiar mai mult, dar și această soluție fiind instabilă, trebuie perfuzată rapid după prepararea soluției. Efectul tratamentului nu poate fi apreciat înainte de cel puțin 48 de ore de la prima administrare. Stările de comă, sau cele cu afectare generală gravă, este improbabil să aibă un răspuns favorabil la hematină. Doza uzuală este de 4 mg/kg corp, o dată sau de două ori pe zi, dar se pare că și doze de 1—1,5 mg/kg corp, o dată pe zi, au același efect. Doze excesiv de ridicate pot produce leziuni tubulare renale asociate cu eliminarea hematinei prin urină. La dozele recomandate se pot produce, ca efecte secundare, flebite la locul infuziei și efecte anticoagulante tranzitorii. A mai fost pus în aplicare și un preparat cu hem arginat cu hematină liofilizată cu albumină care pare a avea o mai bună stabilitate și mai puține efecte secundare. Instituirea tratamentului cu hematină trebuie făcută numai când diagnosticul de porfirie este cert, deoarece administrarea lui poate să normalizeze excreția precursorilor porfirinici și face astfel diagnosticul mai dificil (1). Un alt neajuns al hematinei este costul ridicat și greutatea obținerii ei în cazuri de urgență.

PORFIRII HEPATICE CU MANIFESTĂRI CRONICE

PORFIRIA CUTANATA FAMILIALĂ (TIP II)

Porfiria cutanată familială (tip II), precoce sau eritrohepatică, este caracterizată prin deficit al enzimei nr. 5, uroporfirinogen decarboxilaza. Ea apare scăzută nu numai în ficat, dar și în eritrocite și în culturile de fibroblaști. Se transmite autosomal dominant, cu forme variate în expresia clinică. Mutația (leziunea biochimică) ar fi situată la punctul G → A, în poziția 860 a genei structurale pentru urogen decarboxilază având corespondent poziția 281 unde Gly → Glu în lanțul proteic.

PORFIRIA CUTANATĂ TARDIVĂ (TIP I)

Porfiria cutanată tardivă „sporadică", simptomatică sau hepatică (tip I) se caracterizează prin scăderea aceleiași enzime însă numai la nivelul ficatului, fiind normală în eritrocite. Aceasta sugerează că defectul genetic ar consta din alt tip de mutație care s-ar transmite autosomal recesiv. În susținerea acestei ipoteze pledează și prezența, exclusiv în această formă, a hemosiderozei hepatice, fierul având un rol important în

inhibarea acestei enzime. Este incomparabil mai răspândită decât forma familială.

Porfiria cutanată tardivă [*porfiria cutanea tarda* (PCT)] este o porfirie fără manifestări acute, fără crize colicative abdominale și fără sindrom neuropsihic, dar cu prezența, în prim plan, a sindromului cutanat.

— Un al treilea tip de porfirie cutanată a fost recent descris. El se transmite ereditar, iar deficitul enzimei nr. 5 este prezent numai în ficat, nu și în alte țesuturi sau celule.

Toate aceste trei tipuri au manifestări similare și sunt greu de diferențiat.

Frecvență. Este cel mai des întâlnită dintre toate formele de porfirie, cel puțin pentru țara noastră, unde nu există forme endemice ca porfiria sud-africană sau cea suedeză. Ea se întâlnește predominant la bărbați între 30 și 50 de ani.

Etiopatogenie. Deși este dovedit rolul substanțelor chimice în apariția ei, este discutată și asocierea unei susceptibilități genetice (predispoziție familială). În acest tip de porfirie este cel mai evident faptul că factorii ereditari și cei de mediu se potențează reciproc. Etilismul cronic joacă un rol predominant în antecedentele bolnavilor (circa 3/4 din cazuri). Alcoolul poate stimula sinteza hepatică de hem și de porfirină. Dar, înainte ca bolnavul să dezvolte fotosensibilitatea cutanată, este necesară contribuția și a altor factori agravanți, ca unii agenți chimici și medicamentoși, hepatite cronice etc. Boala apare uneori la bărbații tratați cu estrogeni pentru cancer de prostată sau la unele femei tratate cu estrogeni sau contraceptive orale.

Tabloul clinic este dominat de *sindromul cutanat*, ceea ce face ca bolnavii să fie tratați mai mult în serviciile de dermatologie, deși boala are ca substrat patogen ficatul. Modificările cutanate constau în hipersensibilitate la traumatisme minore, modificări în pigmentarea pielii, hipertricoză, îngroșarea cu induratia pielii și fotosensibilitatea, localizate pe zonele expuse la soare, dar cu respectarea mucoaselor. Simptomul comun în PCT este apariția unor vezicule sau bule la cele mai mici atingeri mecanice. Ele reprezintă manifestările cele mai evocatoare de boală și sunt localizate mai ales pe dosul mâinilor și degetelor și mai rar pe urechi, tâmple, față, ceafă. Veziculele au un diametru de circa 15 mm, dar pot atinge și dimensiuni de 3—4 cm. La început sunt superficiale, apoi proemină și conțin un lichid sticlos sau gălbui, mai rar serohemoragic; ele se sparg, se infectează, iar alteori se usucă. Apariția lor este precedată de senzație de arsuri sau prurit și uneori de plăci mici albicioase (milia). Concomitent se văd diferite aspecte ale acestor etape: vezicule, cruste, macule pigmentate, cicatrice etc. Durata stadiului de vezicule este scurtă (2—3 zile), dar vindecarea trenează, fiind urmată de alte aspecte cutanate: cicatrice, pigmentări cu aspect de pete atrofice depigmentate (hipo- sau hipermelanoză). Pielea apare mozaicată (discromie) sau comparabilă cu frunza moartă. Unii bolnavi au o înfățișare pronunțat melanică pe care nu au avut-o înainte ca boala să fi devenit patentă. Leziunile cutanate din PCT nu se deosebesc de cele din PV și din CPE.

Hipertricoza este întâlnită în același grad ca și în PV, dar mai puțin pronunțat decât în boala Günther. Acoperirea pielii cu păr de câțiva

mm este electivă pe tâmple, pometi, în jurul sprâncenelor, dar și pe membre; ea este întâlnită și la femei, dar fără semne de virilism. Hipertricoza și hiperpigmentarea sunt semne care, singure, pot atrage atenția asupra prezenței bolii.

Pseudosclerodermia (îngroșare, cicatrizare și calcificare a pielii) este întâlnită în anumite cazuri, dar spre deosebire de sclerodermia primitivă, retrocedează dacă tratamentul este bine aplicat.

Fotosensibilitatea în porfiriile cutanate cronice și chiar cele hepatice în general nu este obligatorie, spre deosebire de cele întâlnite în porfiriile eritropoietice. Bolnavii cu acest sindrom au suportat bine soarele timp de 3—4 decenii, până când a apărut fenomenul cutanat, iar alții continuă să-l suporte și după ce boala a devenit manifestă.

În toate cazurile, ficatul este afectat. Transaminazele sunt crescute și sideremia este mărită, perturbarea metabolismului fierului fiind de obicei prezentă în PCT. Puncția-biopsie hepatică pune în evidență modificări histologice în grade variabile, asociate cu acumulări de fier (hemocromatoză minimă). Ea mai poate evidenția și o fluorescență roșie a parenchimului hepatic, care conține unele cantități de porfirine (uro- și coproporfirine). Deși leziunile cutanate ale PCT nu diferă de cele din PV și CPE, diagnosticul trebuie stabilit cu precizie deoarece tratamentul din PCT este total diferit de al celorlalte porfirii. Manifestările neurologice sunt absente.

Diagnosticul biologic este mai concludent în ce privește afectarea hepatică și metabolismul fierului decât în urmărirea excreției porfirinelor. Precursorii porfirinici lipsesc în urină și fecale, iar uroporfirna poate fi găsită în cantități medii în urină. Izocoproporfirina poate fi de asemenea decelată în cantități reduse în urină și fecale, dar porfirinele totale în fecale sunt mai puțin crescute decât în alte tipuri de porfirii cu fotosensibilitate.

Biopsia hepatică este recomandată pentru stadializarea afectării hepatice.

Tratament. Bulele și ulcerațiile pielii vor fi tratate după procedee de rutină. Terapia specifică se referă la 3 principii etiopatogenice:

a) îndepărtarea cauzelor care duc la depășirea echilibrului funcțiilor hepatice;

b) reducerea nivelului de fier hepatic (prin emisii de sânge și chelatori);

c) clorochina.

Anumiți produși, aparent inofensivi pentru un individ normal (alcool în doze moderate, alimentație grasă și condimentată, anumite medicamente etc.), devin nocivi în PCT. Bolnavii trebuie să evite alcoolul, estrogenii, preparate cu fier și alți factori ce pot fi nocivi. Regimul de viață va fi ordonat fără suprasolicitări fizice și nervoase, și completat cu o alimentație nenocivă pentru ficat.

Emisiile de sânge au ca scop scăderea acumulărilor de fier din organism și mai ales din ficat. Se începe cu extragerea a 500—600 ml sânge săptămânal sau la două săptămâni până când hemoglobina scade la circa 11 g/100 ml, iar hematocritul la 30—35%. Când s-a ajuns la aceste valori, emisiile trebuie amânate până la revenirea parametrilor la normal. Uneori se obține o remisiune numai după o serie de 5—6 emisii de sânge.

Clorochina produce importante creşteri în excreţia porfirinelor. Se administrează în doze mici (125 mg), de două ori pe săptămână, timp de 6—18 luni, dar poate produce greţuri, indispoziţie, febră. La o bună toleranţă, se pot mări dozele după câteva luni până la 200 mg, cu scopul de a se obţine rezultate mai bune. Clorochina sau hidroxiclorochina sunt în special utile în cazurile în care emisiile de sânge sunt contraindicate.

La bolnavii cu PCT care prezintă şi o afecţiune renală înaintată, şi la care emisiile de sânge sunt contraindicate din cauza anemiei, iar alte medicaţii sunt ineficiente, s-au obţinut recent unele efecte benefice după administrarea de eritropoietină recombinantă, care mobilizează excesul de fier şi permite emisiile de sânge.

PORFIRII SECUNDARE

Alterarea biosintezei hemului apare într-o largă varietate de afecţiuni, în afara porfiriilor. În astfel de cazuri, dozarea porfirinelor sau a precursorilor devine o cale nouă de depistare şi chiar de prevenire a unor boli, ca saturnismul, anumite tipuri de anomalii etc. Spre deosebire de porfiria cutanată tardivă unde, deşi sunt identificaţi factorii toxici, aceştia jucând doar un rol revelator al unor tare preexistente, aflate până atunci în latenţă, în porfiriile secundare, factorii toxici nu joacă nici un rol, caracterul toxic provenind fie din intoxicaţii în proporţii de masă, fie individual, după consumarea de substanţe chimice. Astfel restrâns cadrul nosologic, s-au identificat câteva tipuri de intoxicaţii secundare.

PORFIRII DE ORIGINE TOXICĂ

PORFIRIA „TURCĂ"

Între 1955 şi 1961 a apărut, în unele zone rurale din Turcia, un tip de porfirie cutanată care s-a întâlnit la peste 5 000 de persoane, de ambele sexe, predominant la copii, provocată de consumul de pâine din făină, amestecată, din eroare, cu un fungicid, hexaclorbenzenul. Cu toată evidenţa agentului etiologic, manifestările clinice nu au fost egale la toţi consumatorii. Din sutele de familii la care s-au depistat cazuri, la unele s-au semnalat doar îmbolnăviri sporadice, în timp ce la altele frecvenţa a fost evident crescută, mai ales între fraţii şi mai ales gemenii homozigoţi.

PORFIRIA LA POPULAŢIA AFRICANĂ BANTU

În afara porfirinei variegata cu frecvenţă ridicată la populaţia sud-africană albă, la peste 10 000 de locuitori din populaţia neagră a fost observată şi o porfirie cutanată, agentul provocator fiind o băutură alcoolică autohtonă, tradiţională, cu conţinut de fier, alcool izoamilic şi metaboliţi de *Aspergillus fumigatus,* cu care băutura era contaminată în cursul procesului de fabricare.

Atât „porfiria turcă" cât şi „porfiria populaţiei Bantu" din Africa de Sud sunt variante ale „porfiriei cutanea tarda". Manifestări asemănătoare au fost observate şi după alte tipuri de intoxicaţii ca cele cu di- şi triclor fenoli, dioxin etc.

SATURNISMUL

Plumbul este un metal ce se găsește, asemenea fierului, pretutindeni în natură. Este cunoscut și prelucrat încă din antichitate pentru proprietățile sale metalurgice. Intoxicația cu Pb se realizează mai mult individual decât prin afectări colective. Forma de pătrundere a Pb în organism este multiplă ca și circumstanțele de intoxicare. Cele mai multe sunt profesionale: tipografii, fabrici de radiatoare, restauratori de picturi vechi descojite, garajiști ce inhalează gaze de eșapament etc. Dintre cele alimentare, pe primul loc se situează persoanele ce consumă țuică de casă din alambicuri cositorite ce conțin un mare procentaj de Pb. Absorbția digestivă este cea mai frecventă cale de pătrundere a Pb în organism (circa 90%). Procentajul resorbit pe această cale, la adult, este de circa 10%, iar la copil de 50% ceea ce explică marea vulnerabilitate a copilului la acest tip de intoxicare. Calea respiratorie este a doua cale de contaminare posibilă (circa 10%) ce afectează îndeosebi muncitorii industriali.

Cinetica plumbului. Odată absorbit, Pb vehiculează, în peste 90%, în eritrocite și în sub 10% pe cale plasmatică. În organism se repartizează pe trei sectoare: vascular, parenchimatos (ce grupează celulele țintă) și sectorul osos în care este depozitat peste 90% din Pb reținut în organism. Schimburile între aceste sectoare sunt foarte inegale. În primele două el se mobilizează ușor, în timp ce Pb fixat pe oase este foarte puțin mobil. Astfel, perioada de înjumătățire a Pb din sectorul vascular este de circa 40 de zile, în timp ce pentru Pb fixat pe sistemul osos este de circa 2 500 de zile (7 ani). Pb suferă și trecere transplacentară, explicându-se astfel riscul intoxicației fetale când mama este expusă (efect fetotoxic). Eliminarea Pb este mai ales biliară; 90% se găsește în fecale și numai sub 10% se elimină prin rinichi.

Mod de acțiune. Pb inhibă un anumit număr de activități enzimatice, mai ales participante la sinteza hemoproteinelor. Cea mai perturbată este cea din sinteza hemului și se exercită asupra 3 enzime din cele 8 care fac parte din acest ciclu: AAL dehidrazei (+++) care este enzima nr. 2, coproporfirinogen decarboxilazei (++), enzima nr. 6 și asupra enzimei nr. 8, hemisintetaza sau ferochelataza (+++). Aceasta explică tulburările biologice din saturnism. Blocarea acestor enzime duce la creșterea substraturilor dependente de ele: AAL, copro III și proto III (vezi tabelul 36.I). Primii doi produși intermediari fiind hidrosolubili se elimină prin urină, iar al treilea se acumulează în eritrocite. Pb scade, de asemenea, durata de viață a eritrocitelor printr-un efect de membrană și poate provoca un anumit grad de hemoliză. El are numeroase locuri de acțiune în organism (encefal, nervi periferici, pereți vasculari, metabolismul uric etc.) unde acționează, mai ales, prin inhibarea proteinelor cu grupări tiol (-SH).

Tabloul clinic, în forma sa completă prezintă în principal manifestări digestive și neurologice. Cele digestive se traduc prin colica saturnină, criză dureroasă abdominală cu aspect subocluziv ce evoluează prin paroxisme predominant periombilicale. Ea poate uneori mima o urgență chirurgicală, lipsesc însă contracturile musculare, pulsul este normal, uneori apare o ușoară hipertensiune arterială. În ajutorul diagnosticului clinic este prezent lizereul gri-albăstrui gingival sau al coletului incisivilor

și caninilor (lizereul Burton) sau pete de aceeași culoare ale mucoasei jugale (petele Gübler). Manifestările neurologice pot fi acute: encefalopatia saturnină (excepțională la adult) și cronice, foarte frecvente. Afectarea măduvei spinării provoacă manifestări asemănătoare cu cele din scleroza laterală amiotrofică. Afectarea cea mai întâlnită este cea a sistemului nervos periferic care este aproape exclusiv de tip motor, interesând mai ales grupurile musculare mai mult folosite (mușchii mâinii, ai umerilor ș.a.). Efectele asupra sistemului osteoarticular se traduc prin poliartralgii, crize de gută, iar asupra rinichilor, prin nefropatie tubulointerstițială.

Sindromul biologic. Dozajul plumbului în sânge reflectă impregnarea produsă cu săptămâni înainte de efectuarea examenului de laborator. Cantitatea medie de Pb este de 16 μg/100 ml sânge la bărbați și de 11 μg/100 ml la femei; dozarea plumbemiei este însă supusă la numeroase erori. Plumburia provocată reflectă mai fidel impregnarea sectorului vascular și parenchimatos întrucât aceasta permite eliminarea din stocaj a plumbului aflat în organism. Mobilizarea Pb se face prin administrarea unui chelator (EDTA-calcic) urmat de dozajul în urina din 24 h (sau la 6 ore în testul scurt). Normal, după 24 h se elimină circa 1 mg Pb, iar după 6h 0,5 mg.

Dozajul fluorometric al protoporfirinelor eritrocitare care poate fi rapid efectuat este un test fidel de depistare a saturnismului și, în același timp, cel mai precoce. Creșterea protoporfirinelor eritrocitare este întâlnită însă și în anemiile feriprive, precum și în protoporfiria eritropoietică (N<5 μg/g Hb sau 300—600 μg/l de eritrocite). Dozajul AAL urinar este o reflectare indirectă a impregnației saturninice și traduce gradul de inhibare a AAL dehidrazei, dar testul este destul de puțin sensibil (N<5 mg/g de creatinină) (1,6). Coproporfirina este crescută în urină.

Tratament. În cazurile certe se utilizează diverși chelatori ca EDTA (Edetamin), DMPS (acid dimercaptopran sulfonic), DMS (acid dimercapto succinic), BAL (dimercaptopropanol), D-penicillamina, care se administrează sub control riguros, fiecare din agenții chelanți putând da reacții adverse serioase. Tratamentul este de obicei eficace în cazurile fără afectare a SNC și discutabil la bolnavii cu encefalopatie.

PORFIRII SECUNDARE UNOR BOLI ENDOGENE

ANEMII SIDEROPENICE

În anemiile sideropenice în care anemia este secundară producerii de hem pentru formarea hemoglobinei ca și inhibării secundare a sintezei de globină se constată acumulări de protoporfirină endoeritrocitară. Determinarea acesteia a devenit un test de diagnostic diferențial al anemiei sideropenice, față de anemiile secundare din procese inflamatorii.

ANEMII SIDEROBLASTICE

Tulburări mai puțin semnificative ale sintezei porfirinelor au fost decelate în anemii sideroblastice, anemii megaloblastice, hemolitice, leucemii, policitemia vera, limfoame maligne etc., ca și în unele boli nehematologice (ciroză, adenocarcinom etc.).

BIBLIOGRAFIE

1. ANDERSON K.: În WILLIAMS W. și colab. (eds.): Hematology, Edit. Mc.Graw-Hill, 1990, 722—742.
2. BRODIE M. J., GOLDBERG A.: Clin. Haematol. 1980; 9: 253.
3. CAFFE L. și colab.: Viața med. 1956; 5: 18.
4. CĂPUȘAN I., ILEA V.: Pediatria (Buc.) 1959; 2: 165.
5. CONDACS E., RĂDULESCU I. C., CAROLI T.: Porfiriile, Edit. Medicală, București, 1970.
6. CONSO F.: Rev. Prat. 1990; 41 (16): 1509.
7. GHEORGHIU G.: Contribuții la studiul porfiriilor cutanate, Teză I.M.F., București, 1969.
8. GHEORGHIU G., FORSEA D.: Dermat. Vener. 1969; 14: 79.
9. GUIDON C. și colab.: Sem. Hôp. Paris 1987; 63: 2761.
10. IPPEN H., FUCHS T.: Clin. Haematol. 1980; 9: 323.
11. JOUGLARD J. și colab.: Sem. Hôp. Paris 1987; 63: 2767.
12. KUSHNER J. .B.: New Engl. J. Med. 1991; 324 (20): 435.
13. MAGNUS I. A.: Clin. Haematol. 1980; 9: 273.
14. McCOLL K., GOLDBERG A.: Clin. Haematol. 1980; 9: 427.
15. MOORE M. R.: Clin. Haematol. 1980; 9: 227.
16. NICULESCU T. și colab.: Arch. Mal. Prof. 1984; 15: 37.
17. PELLISIER J. P., SERRATRICE G., TOGA M.: Sem. Hôp. Paris; 63: 2747.
18. SAYAG J.: Sem. Hôp. Paris 1987; 63: 2753.
19. SMITH A. G., DE MATTEIS F.: Clin. Haematol. 1980; 9: 399.
20. VEVERA V., STROE S.: Med. Int. 1966; 18: 849.
21. VĂLCU A.: Porfiriile. În: Berceanu Șt. (ed.): Hematologie clinică, Edit. Medicală, București, 1977.
22. VĂLCU A.: Eritrocitul, Edit. Medicală, București, 1977, 268.
23. VĂLCU A., NISIPEANU P.: Viața med. 1973; 20: 171.
24. WALDENSTRÖM J.: Haematol 1981; 14: 231.
25. WHERBY M.: În Leavell and Thorup: Fundamentals of Clinical Haematology, Edit. Saunders Comp., Londra, 1987, 74.

TABELUL 36.III

Clasificarea porfiriilor cu principalele lor caracteristici

	DENUMIREA BOLII	PATOGENIE				CLINICĂ			ELIMINĂRI DE PORFIRINE ȘI PRECURSORI PRN		
		Tip și localizare	Enzima deficitară	Numărul enzimei	Mod de transmitere	Debut și frecvență	Manifestări cutanate	Manifestări extracutanate	Urină	Scaun	Eritrocite
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
PORFIRII EREDITARE	Porfiria cu deficit de AAL dehidrază	Hepatic — cromosom 9	δ-aminolevulinic dehidrază (la valori de 1—2%) (AAL dehidrază)	2	Recesiv	Copilărie 3 cazuri descrise	Fără	• Neurologice ca în PAI • Dureri abdominale	AAL=↑↑↑ COPRO=↑↑↑ PROTO=N	COPRO=↑	PROTO=↑↑↑ AAL-D redusă în eritrocite la 1—2%
	Porfiria acută intermitentă (PAI)	Hepatic — cromosom 11	Porfobilinogen dezaminază sau Urogen I sintetază	3	Dominant	20—25 de ani Relativ frecventă	Fără	• Dureri abdominale *sine materia* • Neuropatii • Psihopatii	AAL=↑↑↑ PBG=↑↑↑ URO=↑↑↑ COPRO=↑	Absent	Absent
	Porfiria eritropoietică congenitală (PEC)	Eritropoietică — cromosom ?	Uroporfirinogen III cosintetază	4	Recesiv	Copilărie Circa 150 cazuri descrise	Fotosensibilitate: foarte pronunțată • vezicule • ulcera-	• Dinți cu fluorescență roșie la lumina ultravioletă	URO=↑↑↑↑ COPRO=↑↑↑↑ (izomeri I — 90%, dar și intermediari tip 7, 6, 5)	COPRO=↑↑ URO=↑ (tip I)	PROTO=↑↑↑ URO=↑ (tip I) COPRO=↑ Fluorocite (SP) Fluoro-

						ții infectate • cicatrice mutilante Hipertricoză	• Anemie hemolitică	AAL=N PBG=N		blaști (MO)
Porfiria cutanea tarda (PCT)	Hepatică și secundară — cromosom 1	Uroporfirinogen decarboxilaza	5	Dominant (dar este rar ereditară)	Vârstă medie (30—50 ani) Relativ frecventă	Fotosensibilitate redusă • veziculele infectate nemutilante • discromie	• Scăderea funcțiilor hepatice • Hemosideroză hepatică	AAL= =N~↑ PBG=N URO=↑	URO=↑ COPRO=↑↑	Porfirine plasmatice decelabile fluorometric
Coproporfiria ereditară (CPE)	Hepatic — cromosom 9	Coproporfirinogen oxidază	6	Dominant	Adulți tineri	Asemănătoare celor din PCT	• Dureri abdominale *sine materia* • Neuropatii • Psihopatii	AAL=↑↑ PBG=↑↑ URO=↑↑ COPRO= =↑↑↑	COPRO=↑↑↑	Absent
Porfiria variegata (PV)	Hepatic — cromosom ?	Protoporfirinogen oxidază	7	Dominant	Adulți tineri Relativ frecventă (rară?)	Asemănătoare celor din PCT	• Dureri abdominale *sine materia* • Neuropatii • Psihopatii	AAL=↑↑ PBG=↑↑ URO=↑ (N) COPRO= =↑↑	PROTO ↑↑↑ COPRO ↑↑	Fluorescența porfirinelor plasmatice

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Proto-porfiria eritro-poietică (PPE)	Eritro-hepatic — cromo-som ?	Hemisin-tetază sau Feroche-latază	8	Domi-nant	Copi-lărie Relativ rară	Fotosensi-bilitate cu: • arsuri • edeme • eritem	• Funcţii hepatice defici-tare • Măduvă osoasă şi ficat cu fluo-rescen-ţă	Porfirinele şi precur-sorii porfirinici NORMALI		PROTO ↑↑↑↑ plus fluo-rescenţă tranzito-rie
PORFIRII SECUNDARE										
Porfiria în saturnism	Hepatic şi tisu-lar	Acţiunea Pb asu-pra: AAL-de-hidrazei Coprogen oxidazei şi HEM-sin-tetazei	2 6 8	Intoxi-caţii indivi-duale cu Pb sau în colec-tivităţi restrîn-se	Frec-ventă la adulţii de vârstă medie	Fără	• Consti-paţie Sindrom dureros abdo-minal suboclu-siv Colici abdo-minale • Amio-trofie	AAL↑↑ COPRO ↑↑ Plumbu-rie ↑	COPRO ↑	PROTO ↑↑

XXXVII

HEMOCROMATOZA

AL. VÂLCU

Hemocromatoza, boală metabolică cronică, este caracterizată prin acumulări excesive de fier în organism, predominând în anumite organe ca ficatul, pancreasul, inima etc., având ca implicații secundare fibroze organice și perturbări în funcția acestora. În afară de depunerea generalizată de fier se mai descriu și unele forme (extrem de rare) de depuneri localizate în unele organe (plămân, rinichi etc.). Hemocromatoza poate fi genetică sau ereditară (altădată numită idiopatică sau primitivă) și dobândită sau secundară (4, 9, 20, 24).

HEMOCROMATOZA GENETICĂ (HG) SAU EREDITARĂ

Prima recunoaștere a bolii a provenit din necropsiile efectuate la bolnavi cu ciroză pigmentară, iar denumirea de hemocromatoză a fost dată, în 1889, de către Recklinghausen. Tot el a numit și depozitarul de fier „hemosiderină" crezând că derivă din sânge.

Etiologie. HG este o boală ereditară, mai puțin rară decât a fost diagnosticată. Modul ei de transmitere este autosomal recesiv cu expresie biologică variabilă la generații diferite. Deși HG este prezentă încă de la naștere, ea rămâne, timp de decenii, fără expresie clinică. De aceea o anchetă familială este necesară pentru depistarea din timp a bolii, înainte ca și alți membri ai familiei să ajungă la forme clinice de decompensare.

În HG gena responsabilă este situată pe brațul scurt al cromosomului 6, în proximitatea locusului HLA. În formele cu expresivitate completă participă două alele lincate stabilite pe locii A și B. În jur de 70% din bolnavi sunt purtători ai alelei HLA-A. Interesul practic al grupajului HLA, în caz de suspiciune de HG, este slab. Interesul acestui grupaj devine, în schimb, esențial când diagnosticul de HG este confirmat prin

anchetă familială. În acest caz, haplotipul HLA poate servi ca marker pentru depistarea altor cazuri de HG în familie. Cunoscându-se haplotipul HLA, s-a putut realiza gruparea membrilor unor familii afectate, în homozigoți (două haplotipuri comune), heterozigoți (un haplotip comun) și normali (fără haplotip). Frații și surorile identici bolnavului sunt susceptibili de a avea HG. Frații și surorile semiidentici sunt heterozigoți și pot prezenta, în 25% din cazuri o discretă supraîncărcare de

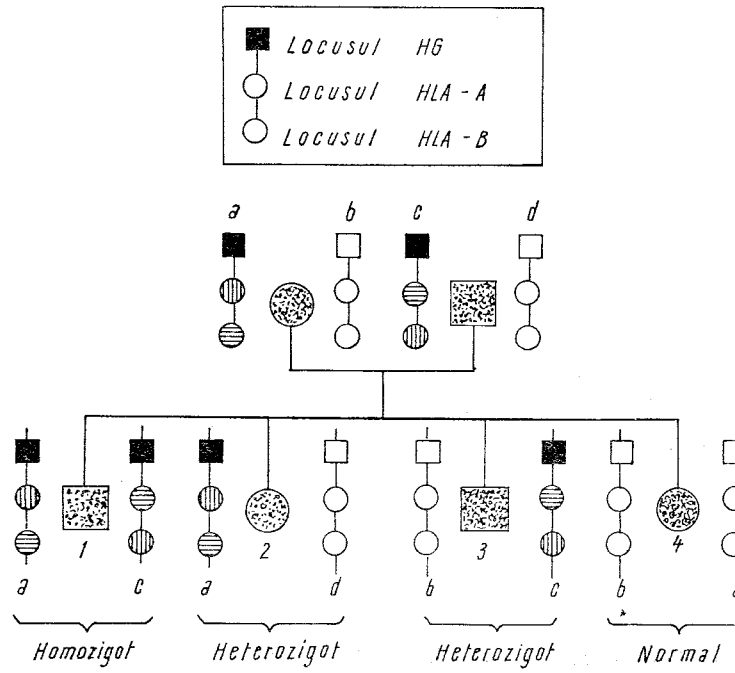


Fig. XXXVII.1. — Distribuția ipotetică a alelelor în acumularea de fier: incidență pentru eventualitatea de homozigot, heterozigot sau normal (după Motulsky, 1992).

Fiecare alelă indică un HLA haplotip printre membrii familiei cu dezvoltare completă a hemocromatozei genetice (1). Relația topografică între gena ⇔ și locusul HLA ⇔ indică, cu aproximație, incidența posibilă. Mama pacientului are 6 cromosomi (3×2) notați prin a și b. La tată alelele apar tot pe 6 cromosomi notați prin c și d. Pacientul care moștenește ambele gene mutante va fi homozigot.

fier. Frații și surorile HLA diferiți sunt indemni față de tară. Ancheta este valabilă când se suspectează un membru de familie ai cărui părinți sunt ambii heterozigoți (fig. XXXVII.1). Absența markerilor la populația heterozigotă face dificilă separarea față de populația nepurtătoare de tară (24). Această anchetă, bazată pe grupaj HLA, trebuie să cuprindă frații, surorile și copiii trecuți de 10 ani, avându-se în vedere riscul ridicat de heterozigotie la această maladie (16). Diferențierea homozigoților pe baza sistemului HLA este dificilă, dar stabilirea de „HLA-status"

poate fi de ajutor în aceste cazuri (25). Pentru detectarea heterozigoților în populația generală nu există teste.

Pe baza acestor studii s-a stabilit că circa 10% din populație ar fi heterozigotă pentru gena HG, iar 0,2—0,3% ar fi homozigotă. Sub acest aspect HG ar fi una din cele mai frecvente boli genetice din Europa. Se estimează că pe glob ar exista circa 250 000 000 de indivizi care suferă, din cauze diferite, de supraîncărcare cu fier (8, 11, 12, 15). Heterozigoții au un risc crescut față de subiecții normali de a dezvolta supraîncărcare cu fier, în anumite condiții, ca de exemplu în porfiria *cutanea tarda*.

Fiziopatologie. Celulele organismului nu-și pot desfășura activitatea lor specializată, indiferent de funcția ce o îndeplinesc, fără prezența fierului. Excesul de fier perturbă însă activitatea metabolică celulară, devenind toxic. În afara fierului activ (enzime, Hb etc.), în organism se realizează unele acumulări de fier în celule specializate cu stocarea unor mici rezerve de fier, celule ce aparțin sistemului macrofagic. În condiții normale, un subiect cu o constituție robustă și înfățișare pletorică, nu trebuie să dețină un total care să depășească 6—7 g fier (normal 4—5 g). Depozitarea sa în organism este o funcție fiziologică care, în condiții normale, nu depășește cu mult 1 g la adult, ceea ce echivalează cu circa 20% din fierul total la bărbați și mai puțin la femei. Surplusul limitat de fier în depozitele fiziologice este bine tolerat, sideropexia fiind o funcție naturală de acumulare a unor rezerve. Tezaurizarea fierului reprezintă însă acumularea în exces a unor stocuri suplimentare. Absorbția fierului este proporțională cu creșterea sa în organism. La homozigoții de HG are loc o creștere necorespunzătoare a absorbției, dublată, în parte, și de un regim alimentar bogat în fier, precum și de factori care accentuează această absorbție (etilism). În HG, unde defectul metabolic acționează în mod ritmic, încă de la naștere, la vârsta adultă depășește de 5—10 ori valorile normale. Plusul de fier se acumulează în celulele sistemului macrofagic, iar când acesta este saturat, se depozitează și în alte țesuturi. Atâta timp cât fierul nu este stocat în celulele parenchimatoase, acumularea lui nu are semnificații clinice însemnate, neputând să creeze disfuncții celulare și de organ, importante. Alterările tisulare încep să se manifeste când încărcarea cu fier erupe peste membrana lizosomală, iar celelalte organite citoplasmatice încep să fie invadate de acest fier (24).

În hemocromatoze fierul se acumulează cu precădere sub formă de hemosiderină în cantități mari, în general peste 20 g, iar în cazuri extreme până la 40—80 g. Depunerile de pigment feric au loc în numeroase organe, dar acumularea în acestea nu este identică. În unele (ficat, pancreas) acumularea se poate ridica la valori de 50—100 de ori mai mari față de normal; în inimă acumularea este de 10—15 ori mai mare, iar în splină, rinichi și piele de circa 5 ori. Mai discret impregnate sunt oasele, cartilajele, sinovialele, iar sistemul nervos este cel mai puțin afectat (15). Deși fierul este pentru SRH relativ lipsit de nocivitate, depunerea lui în celulele parenchimatoase este dăunătoare. Normal fierul este reținut sub formă de feritină, dar prin acumularea lui în exces se depune ca hemosiderină. Cu cât avansează depunerea de hemosiderină, cu atât se dezvoltă și hemosideroza, crește fibroza și se instalează ci-

roza (25). Manifestările clinice apar când acumularea atinge sau depășește 15—40 g (față de 0,2—2 g la normali).

Patogenie. În HG supraîncărcarea cu fier se instalează progresiv prin două mecanisme: hiperabsorbție intestinală (mai ales în primii centimetri ai duodenului) și hiperaviditate a hepatocitelor față de fier, ficatul fiind primul și cel mai important organ în patogenia hemocromatozei. Fierul se depune peste tot în hepatocite: în citosol, în organite (mai ales în mitocondrii), pe bordurile reticulului endoplasmic, în membrană (unde stimulează peroxidarea lipidică) etc. (15). Cauza hiperavidității absorbției intestinale nu este cunoscută. Defecțiunea de bază ar putea fi localizată la nivelul relației reciproce dintre ARN-m al feritinei și receptorii de ARN-m ai transferinei din mucoasa intestinală (24).

Clasificare. Supraîncărcarea organismului cu fier este întâlnită în circumstanțe diferite, ceea ce explică separarea hemocromatozei în următoarele forme patogenetice și clinice:

A. *Hemocromatoza genetică* (sau ereditară)

B. *Hemocromatoze secundare* (sau hemosideroze) care pot fi:

1) *terapeutice* (de exemplu posttransfuzionale), ca în talasemia homozigotă, anemia aplastică, anemiile diseritropoietice, mielofibroză ș.a.; în acestea se realizează o accentuată intricare cu bolile hematologice de bază (mai ales cu talasemia homozigotă) dând naștere la forme mixte de hemocromatoze secundare;

2) *nutriționale*, de exemplu hemocromatoze colective la unii negri Bantu din Africa de Sud care consumă o băutură alcoolică; aici patogenia este, de asemenea, intricată;

3) *endogene* (în afecțiuni hepatice) și metabolice (etilismul cronic, porfiria *cutanea tarda* etc.).

Tablou clinic. Boala are o lungă perioadă de latență; primele simptome sunt atât de discrete încât pot trece neobservate timp îndelungat. Boala fiind o eroare metabolică moștenită începe să acționeze încă din primul an de viață prin acumulare, progresivă, a unui surplus de fier în diverse organe. Există forme paucisimptomatice sau asimptomatice ce pot fi identificate doar prin depistaj familial.

În formele cu „penetranță crescută" debutul poate apărea chiar la sfârșitul adolescenței sau curând după începutul celei de-a treia decade. Primele simptome sunt necaracteristice și se instalează treptat: astenie, alterarea treptată a stării generale, apatie, dureri sau crampe musculare și articulare, scăderea libidoului etc. Pigmentarea pielii este atât de insidioasă încât nu este remarcată de cei din jur decât târziu, odată cu instalarea unei visceralizări. Până la constituirea formei complete există o lungă perioadă de forme de trecere, incomplete, fără să existe reguli fixe în ceea ce privește succesiunea simptomelor. Excepțional, tabloul clinic se poate constitui în totalitate în decurs de câteva săptămâni sau luni, de exemplu cu prilejul unei afecțiuni intercurente. În unele forme heterozigote, dar cu expresie clinică, debutul, pe lângă că apare tardiv (în decada a 5-a sau a 6-a), este și mai puțin caracteristic.

În perioada de stare, în forma complet constituită, simptomatologia este bogată, determinată de caracterul plurivisceral al supraîncărcării organelor cu fier. Deși fierul se depune peste tot în organism, unele or-

gane acumulează cantități mai mari și produc manifestări clinice mai grave. HG fiind o boală cu afectarea mai multor organe și sisteme, se manifestă printr-o mare varietate clinică. Manifestările majore ale bolii sunt reprezentate prin triada: pigmentarea pielii (melanodermie), ciroză hepatică (ciroză pigmentară) și diabet zaharat (diabet bronzat), întâlnite la majoritatea bolnavilor. La acestea se adaugă tetrada formată din tulburări cardiace, endocrine, digestive și osteoarticulare. În momentul în care impregnarea cu fier depășește un anumit prag, boala se manifestă, pe de o parte, prin tulburări ale organului afectat și, pe de altă parte, printr-un grup de simptome generale, expresie a unei afectări pluriviscerale (7, 17, 20).

1) *Hiperpigmentarea tegumentelor și a mucoaselor (melanodermia)* este semnul cel mai frecvent al HG. Ea este generalizată, dar este mai evidentă pe părțile descoperite (față, ceafă, dosul mâinilor etc. și pe cicatrice); ea poate trece neobservată la bolnavii cu tenul închis. Ea este produsă de participarea, în proporții variabile, a hemosiderinei și a melaninei (pigment lipsit de fier) care conferă pielii o nuanță gri-metalică sau plumburie, comparabilă cu ardezia. Biopsia de piele are o valoare redusă pentru diagnostic din cauza acumulării, în mai mică măsură a fierului față de melanină. Tegumentele sunt de obicei uscate, cu tendință la atrofie și se descuamează ușor (aspect solzos). Părul de pe cap este rar, iar firele sunt moi și subțiri; el lipsește în axile, iar în regiunea pubiană este redus.

2) *Afectarea hepatică.* Ciroza este prezentă în toate cazurile (ciroză pigmentară). Hepatomegalia se constată în peste 90% din cazurile constituite; ea crește progresiv putând atinge ombilicul. Ficatul este dur, regulat, cu marginea ascuțită și, de cele mai multe ori, este nedureros. Aceste semne se însoțesc adesea de steluțe vasculare, eritem palmar, ginecomastie etc. De obicei nu se însoțește de icter, splenomegalie, varice esofagiene sau ascită, ca în ciroza tipică. La biopsie se constată o surprinzătoare lipsă de corelație între depozitele mari de hemosiderină, dublate de modificări structurale importante și absența semnelor clinice. După o lungă perioadă de latență evoluția este rapid terminală, cu semne majore de ciroză decompensată (16, 24).

În formele constituite, leziunile hepatice se caracterizează, în principal, prin două trăsături fundamentale: supraîncărcarea cu fier și modificări macro- și microscopice de tip cirotic. Macroscopic ficatul își dublează volumul, are o culoare roșcat-ruginie cu nuanță de ocru („aramă veche") și este presărat cu noduli mici și regulați, ca în ciroza micronodulară. Această culoare este dată de agregatele de hemosiderină care se acumulează în ficat. Semnele de hipertensiune portală lipsesc sau apar în stadiile terminale. Examenul histologic evidențiază o rețea de reticulină abundentă; colestaza este absentă, iar infiltratele de tip inflamator sunt reduse. Acumularea de fier este pusă în evidență prin colorația Perls. Imaginile diferă, de la granule mici de feritină în citoplasma hepatocitului, până la depozite mari și inegale de hemosiderină, când boala este pe deplin constituită. Pe măsură ce fierul se acumulează, feritina se condensează în hemosiderină. Fierul este prezent în ficat în celulele Kupffer, fibrocite, epiteliul biliar, macrofage, septurile conjunctive, capsula hepatică etc. Hepatocitele își păstrează structura normală

în primele faze ale bolii, însă în stadiile terminale, sau când HG se complică cu etilismul cronic, se descriu leziuni de tipul degenerescenței grase a hepatocitului. Carcinomul hepatic a fost întâlnit la circa 30% din cazuri (28). Riscul de carcinom nu dispare chiar dacă prin tratament fierul este îndepărtat.

Conținutul total în fier al ficatului poate ajunge la valori foarte mari (până la 30—40 g) cu o concentrație de peste 10 mg/100 g masă hepatică, ceea ce reprezintă 2—3% din greutatea organului sau 5—10% din greutatea substanței uscate. Testele hepatice sunt, în primele stadii, cel mai frecvent normale, cu excepția unor deficiențe moderate ale transaminazelor.

Splenomegalia este întâlnită în aproximativ 50% din cazuri.

3) *Diabetul bronzat.* Alături de ficat, pancreasul este organul cel mai încărcat cu fier. Diabetul este prezent în 30—50% din cazuri. Apariția lui este un semn revelator de boală. Instalarea diabetului este insidioasă, putând fi revelată cu ocazia efectuării unei hiperglicemii provocate. Cu timpul se constituie un diabet sever insulinodependent, instabil și dificil de echilibrat, necesitând, adesea, cantități mari de insulină; alteori diabetul este insulinorezistent. Când diabetul se instalează mai timpuriu și evoluția bolii este lungă pot apărea și complicațiile cunoscute ale acestuia. Funcția exocrină a pancreasului este puțin afectată. Macroscopic pancreasul apare mărit, indurat și impregnat cu pigment. În 90% din cazuri se dezvoltă un proces de scleroză difuză, de intensitate variabilă, mai puternic în jurul acinilor și a celulelor Langerhans. Granule de hemosiderină apar mai mult în jurul celulelor acinoase și în țesutul conjunctiv interstițial (2, 14, 17, 20).

4) *Cardiopatia.* Afectarea miocardului prin impregnare cu fier este una din determinările majore ale hemocromatozei. Clasic cardiopatia este obstructivă, iar insuficiența cardiacă globală, când este prezentă, este severă, agravând prognosticul vital, mai ales când apare la un tânăr. Odată instalată, insuficiența cardiacă este greu reductibilă. Macroscopic, cordul apare mult mărit de volum. La examenul microscopic, miocardul apare frecvent impregnat cu fier, fiind singurul mușchi infiltrat din organism. Microscopic s-a mai constatat fibroză, fragmentare, edem și necroza celulelor miocardice. Prezența fierului în jurul nodulului Aschoff-Tawara explică tulburările de ritm și de conducere. Depozitele de hemosiderină în miocard nu sunt totdeauna în raport cu gradul de insuficiență cardiacă. Riscul unei cardiopatii coronariene, incluzând infarctul de miocard, susținut de unii autori nu a fost confirmat prin cercetări recente.

5) *Tulburările endocrine.* Depozite crescute de hemosiderină nu au fost decelate; în cantități moderate se pot constata în hipofiză, suprarenale, testicule, tiroidă etc. Dintre toate afectările endocrine, cea mai frecventă și mai netă este cea a gonadelor care provoacă un hipogonadism evident. La bărbat, involuția caracterelor sexuale primare și secundare, normal dezvoltate până în momentul instalării insuficienței testiculare, se accentuează progresiv, volumul testiculelor putând ajunge până la mărimea unor boabe de fasole. La tineri se poate observa un infantilism disproporționat față de vârstă și un aspect feminizant. La aceștia libidoul scade, erecția devine dificilă, spermatogeneza este săracă, ejacularea slabă, iar ulterior se instalează o impotență sexuală totală. La fe-

meie hipogonadismul se manifestă prin scăderea libidoului, a fecundității și prin menopauză precoce.

Tulburările endocrine sunt, de obicei, pluriglandulare. Afectarea corticosuprarenalelor, a hipofizei, tiroidei, paratiroidei, dar mai ales a glandei pituitare este uneori prezentă, dar semnele care ar putea fi atribuite acestora se intrică cu cele induse de insuficiența hepatică, diabet, insuficiență testiculară etc., încât delimitarea și dependența lor este greu de evaluat. Depozitele de hemosiderină din glandele endocrine sunt în cantitate moderată, fără să se permită concluzia că endocrinopatiile ar fi secundare depunerilor de fier.

6) *Manifestări digestive*. Crizele dureroase abdominale sunt descrise frecvent. Ele se manifestă sub formă de durere epigastrică în hipocondrul drept sau stâng, periombilical sau cu localizare în bară. De cele mai multe ori sunt ușoare, însă persistente, obsedante și greu de influențat de medicația „dispeptică". Prezența lor, mai ales la femei, pune adesea în dificultate pe medic care, la început, nu le poate găsi explicație. Rareori durerile sunt violente și însoțite de vărsături. Anorexia și diareea sunt asociate adesea durerilor.

Tubul digestiv este impregnat de depozite de fier de la un capăt la altul, în proporții diferite, predominanța fiind în segmentele distale (vilozitățile ileale) și mai puțin în cele proximale (jejun și duoden). Biopsia mucoasei gastrice poate contribui la orientarea spre diagnosticul de HG. Macrofagele din corion sunt încărcate cu granule mari de hemosiderină (4).

7) *Manifestările osteoarticulare* au caracter degenerativ. După unii autori (12), 3 din 4 pacienți suferă de această afectare, iar pentru 20—35% este primul semn clinic. Microscopic s-au depistat cristale de pirofosfat de calciu în diferite articulații. Modificările radiologice indică artropatie subcondrală, condrocalcinoză cu microchisturi afectând a doua sau a treia articulație metacarpofalangiană și demineralizare la nivelul articulațiilor metacarpofalangiene, la genunchi și alte articulații mari. Uneori este prezentă o osteoporoză. Subiectiv se manifestă prin accese pseudogutoase sau de reumatism cronic (12).

8) *Manifestări neuropsihice*. Sistemul nervos este puțin afectat în HG. Crize dureroase solare, algii la nivelul extremităților, semne de polinevrită etc. sunt rareori constatate. Manifestările psihice (depresive sau psihonevroze) sunt însă frecvent întâlnite. Astenia se constată în peste 80% din cazuri.

Au fost descrise infecții cu germeni mai puțin comuni care se dezvoltă mai bine în prezența unui exces de fier: *Yersinia enterocolitica, Pasteurella pseudotuberculosis.*

Examene de laborator. Punerea în evidență a unei creșteri a fierului seric implică un plan de teste de laborator ce se efectuează după o schemă în mai mulți timpi. Valorile trebuie interpretate în funcție de metodele de laborator folosite.

1. Hipersideremia. Normal, sideremia este de 20 μmol/l. Există o mare variație individuală a sideremiei: 10—15 la bărbat și 6—40 la femeie. Nu orice fel de hipersideremie este patologică. La acest examen trebuie avută certitudinea că nu au contribuit nici măcar urme de hemoliză. În HG sideremia poate ajunge sau depăși 200 μmol/l. O creștere

relativă (150—200) sau ușor sub aceste limite poate fi întâlnită și în cazurile de etilism cronic.

2. Capacitatea totală de legare a fierului [CTLF sau TIBC (Total Iron Binding Capacity)] are ca valori normale 50—75 μmol/l, cu o medie de 65. În hemocromatoze această valoare este normală sau chiar scăzută, spre deosebire de anemiile feriprive și sarcinile avansate unde este mult crescută (250—3 000 μmol/l). În infecții ea este apreciabil scăzută (fig. XXXVII.2) (tabelul 37.I).

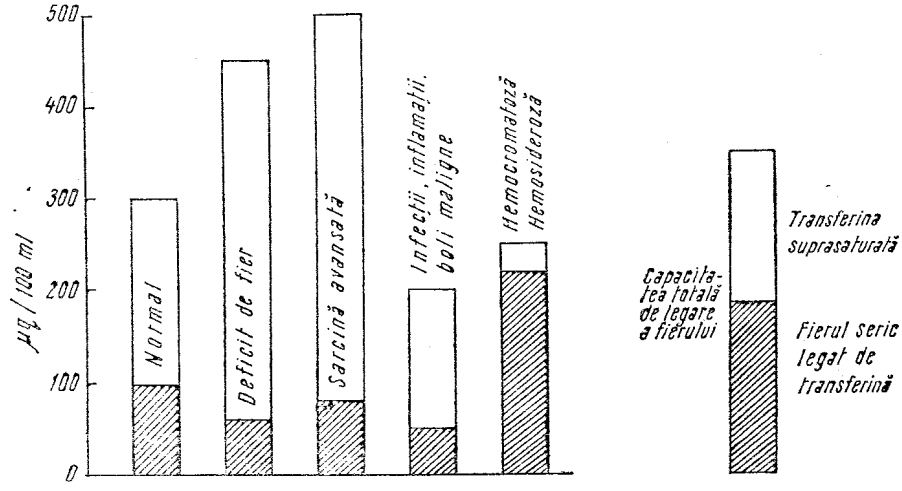


Fig. XXXVII.2. — Fierul seric și capacitatea totală de legare a fierului la siderofilină.

Reprezentare comparativă în condiții de normalitate, față de o stare fiziologică (sarcină avansată) și unele stări patologice (anemie feriprivă, infecții, inflamații și boli maligne, precum și hemocromatoză, respectiv hemosideroză).

3. Saturația transferinei (Sat. T), exprimată în procentaj, se calculează după formula: Sat T=CTLF×100. Ea variază între 10 și 66%, cu o medie de 30%. Acest test prezintă interes pentru a corela sideremia în raport cu proteina transportoare. Este testul cel mai sensibil din această triadă (3, 7, 24).

4. Feritinemia. Dozajul feritinei serice reflectă excelent cuantumul rezervelor marțiale. Dozarea ei este un semn sensibil și precoce a stării carențiale, iar creșterea ei indică un exces marțial. Ea evoluează paralel cu cuantumul fierului hepatic, ceea ce permite supravegherea tratamentului prin sângerări, iar în hipersideremii, repetarea ei permite controlul eficienței tratamentului desaturator (6). Determinarea feritinei serice corelează bine cu mărimea depozitelor de fier, în absența unui consum excesiv de alcool, a unei artrite reumatoide, a unor procese inflamatorii, neoplazice sau hepatice.

Feritina este o proteină ce se găsește peste tot în organism. Ea este formată din 24 de subunități (lanțuri polipeptidice globuloase) asamblate într-o structură sferică compactă ce delimitează o cavitate centrală. Acest

TABELUL 37.I

Repartizare comparativă a valorilor normale față de hemocromatoze și ficatul alcoolic
(după L. W. Powel și K. J. Isselbacher, 1991)

Determinarea	Normal	Hemocromatoză simptomatică	Homozigoți asimptomatici	Ficat alcoolic
Fier plasmatic, µmol/l (µg/dl)	9—27 (500—150)	32—54 (180—300)	de obicei crescut	mult crescut
Capacitatea totală de legare a fierului (µmol/l) (µg/dl)	45—66 (25—370)	36—54 (200—300)	36—54 (200—3 007)	45—66 (250—370)
% de saturare a transferinei	24—46	50—100	50—100	27—60
Feritina serică în µg/l (µg/dl)	10—200	900—6 000	200—500	10—500
Eliminare de fier prin urină (în mg/24 h)	0—2	9—23	2,5	obișnuit sub 5

înveliș proteic are o greutate moleculară de 441 000; el circumscrie (ca o cocă) o zonă micelară, bogată în agregate coloidale, alcătuite din hidroxizi de fier fosfat, ce conțin peste 2 000 de atomi de fier pe moleculă, dar numărul lor poate crește la 4 500, adică la peste 30% din greutatea moleculară a feritinei; în stare de saturare greutatea ei poate crește la circa 1 000 000 (fig. XXXVII.3) (1).

Dozarea excreției urinare a fierului după injectarea unui flacon de Desferal (500 mg) sau de 10 mg/kg indică, în primul rând, eficiența acestui preparat în tratamentul hemocromatozelor secundare (talasemie). Aceasta se efectuează dimineața, prin dozarea înainte de probă și la o oră, respectiv la 6 sau la 24 de ore de la injectare. Cu cât diferențele sunt mai mari, cu atât eficiența tratamentului este mai bună. În condiții de hemocromatoză ea trebuie să depășească, în total, 5 mg fier. Eliminarea la adultul presupus normal de 1,5—2,5 mg sau chiar peste aceste valori (de exemplu 5 mg) ridică suspiciunea, foarte probabilă, a unei HG sau a unei hemocromatoze secundare.

Puncția biopsie hepatică este cea mai fidelă probă din toate mijloacele actuale de diagnostic întrucât ficatul este depozitarul principal de fier al organismului. Acest examen este socotit ca „etalonul de aur" pentru diagnosticul de hemocromatoză (25). Absența depozitelor de fier din preparatele histologice hepatice exclude diagnosticul de hemocromatoză. Pe de altă parte, prezența acestor depozite, fără existența nici unui alt semn clinic sau de laborator, confirmă diagnosticul de hemocromatoză.

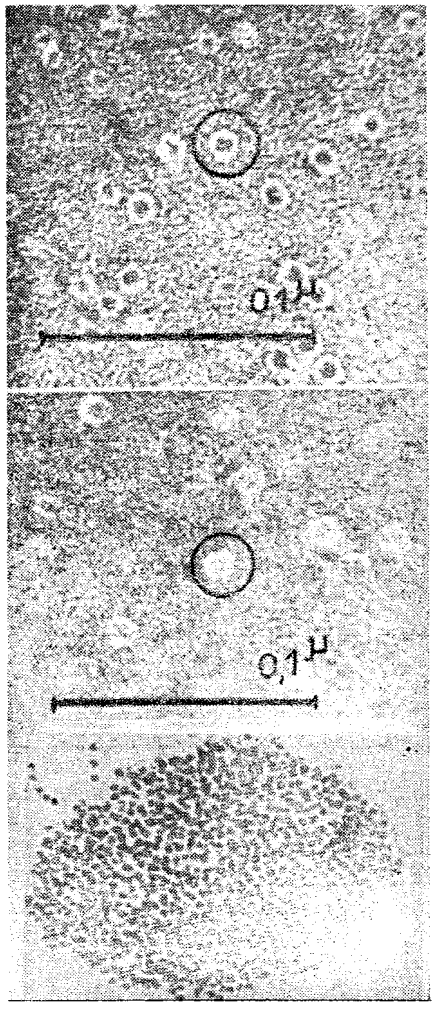


Fig. XXXVII.3. — Molecule de feritină examinate la microscopul electronic (după Bessiss).
Sus: feritina învelește ca o coică miceliile de fier care formează miezul macromolecular în hemocromatoză și în anemiile hipocrome hipersideremice (acrestice);
mijloc: feritina (apoferitina) este lipsită de fier în anemia hipocromă feriprivă;
jos: detaliu dintr-un siderosom într-un eritroblast normal. (Primele două imagini sunt mărite de 450 de ori, iar ultima de 300 000 de ori).

Descoperirea granulelor de fier cu colorația Perls permite stabilirea diagnosticului și într-o fază precoce a bolii. De mare importanță este și stabilirea celulelor în care are loc acumularea de fier. Constatarea depozitelor de fier în hepatocite are o semnificație patologică mai mare decât creșterea acumulării globale de fier; ea permite și stabilirea naturii, homo- sau heterozigotă a HG. Concentrația hepatică a fierului, calculată pe baza biopsiei, este, în mod normal, inferioară valorii de 36 μmol/g de greutate de ficat sec. Raportul: concentrație hepatică a fierului/vârstă, ce depășește indicele 2 sugerează o formă homozigotă.

Spre deosebire de ficat, în care leziunile sunt tipice pentru diagnosticul de HG, măduva osoasă (prelevată prin aspirație sau biopsie) nu aduce nici o contribuție la diagnostic, deoarece eritropoieza nu este perturbată, iar fierul medular este permanent recirculat. În talasemia homozigotă, cât și în anemia aplastică sau anemiile mielodisplazice, în care eritropoieza este profund perturbată, studiul microscopic al măduvei este însă obligatoriu deoarece aduce informații specifice pentru diagnostic.

La aceste examene se mai pot adăuga investigații cu izotopi radioactivi, stabilirea densității parenchimului hepatic cu ajutorul tomografului computerizat și, eventual, examinarea imaginii hepatice prin rezonanță magnetică nucleară (3).

Evoluție, complicații, prognostic. Boala are o evoluție cronică, cu durată de viață variabilă, de obicei mai îndelungată, dar fără un tratament adecvat are un sfârșit letal. Acesta survine la tineri, în general, din cauza insuficienței cardiace și a diabetului, iar la vârstnici, mai mult consecutiv cirozei și a complicațiilor ei. Tratamentul crește cu peste de două ori durata lor de viață, față de a bolnavilor netratați. Complicațiile sunt date de diabet și de asocie-

rile sale specifice. Manifestările clinice sunt corelate și de expresia fenotipică a bolii (la aceasta de cuantumul de fier acumulat și de ritmul lui de acumulare); acesta este dependent și de alți factori, ca pierderile de sânge, ingestia orală de fier etc. (24). În cazurile cu evoluție prelungită, pe fondul unei ciroze pigmentare, se observă, relativ frecvent (25%), apariția unui carcinom hepatic primar. În prezent se studiază și rolul fibrogen și carcinogen al fierului asupra viscerelor și în special asupra ficatului. Prognosticul este mai serios în cazurile de apariție la o vârstă mai tânără și în cele în care survin complicații din partea cordului, rinichiului, ficatului și diabetului. La bolnavii fără ciroză, tratați, supraviețuirea este similară cu cea a populației normale.

Diagnosticul pozitiv nu comportă dificultăți când sunt întrunite principalele manifestări ale bolii: pigmentarea pielii, ciroza, diabetul și afectarea cardiacă. Prezența concomitentă a două din aceste manifestări clinice trebuie să sugereze posibilitatea unei hemocromatoze. La acestea se mai asociază astenia, accesele dureroase pseudogutoase sau reumatoide, hipogonadismul. Certitudinea diagnosticului este dată de examenele de laborator: creșterea sideremiei peste 200 μg/dl, a capacității de saturare a transferazei cu fier (70—100%), a concentrației plasmatice a feritinei (peste 500 μg/ml), eliminarea crescută de fier în urină în testul cu Desferal (peste 5 mg/6 ore). Biopsia hepatică, elementul important al diagnosticului, pune în evidență depozitări de fier în parenchimul hepatic, cu reacție fibroasă variabilă.

Diagnosticul diferențial. Când tabloul clinic nu include mai multe din principalele manifestări ale bolii, ci numai unele disparate, diagnosticul se face cu ciroza posthepatitică și mai ales cu cea alcoolică însoțită de hemosideroză (în care testul cu Desferal este cvasinormal, iar fierul este localizat în celulele reticuloendoteliale), cu diabetul zaharat primar (în care determinările de laborator privind metabolismul fierului dau valori normale) și cu insuficiența cardiacă prin hemocromatoza secundară din talasemia homozigotă, în care semnele clinice ale bolii de bază permit, cu ușurință, precizarea diagnosticului.

HEMOCROMATOZE SECUNDARE (HEMOSIDEROZE)

În afară de HG, fierul poate fi stocat în organism și în alte stări, patologice. Grupul afecțiunilor în care este prezent un surplus de fier este numeros; pe lângă cele în care transfuziile sunt vital necesare, mai există unele boli cu patogenie complexă în care se constată o hemocromatoză secundară bolii de bază.

HEMOCROMATOZA POSTTRANSFUZIONALĂ

Se situează pe primul plan printre bolile în care fierul este în exces. Aceasta se realizează în urma transfuziilor repetate la bolnavii anemici fără pierderi sanguine. Anemiile care sângerează prezintă un circuit de fier în ambele sensuri (intrare-ieșire), fără să existe pericolul acumulării acestuia. La politransfuzați distrugerea eritrocitelor — la scadența dura-

tei lor de viață — eliberează fierul în ser, de unde este depozitat în țesuturi. Se știe că 1 l de sânge transfuzat conține circa 500 mg de fier, iar un bolnav care primește cel puțin 1 l de sânge pe lună, acumulează într-un an 6 g de fier, suficient ca într-un număr redus de ani, boala sa de bază să fie dublată și de un sindrom de hemosideroză cu același spectru de probleme ca și cele descrise în HG. Cum din cele două rele se preferă primul (transfuziile), întrucât acesta are un efect benefic imediat, al doilea, care se instalează în timp, poate fi parțial ameliorat în cursul evoluției bolii prin măsuri preventive și curative.

HEMOCROMATOZE ÎN UNELE BOLI HEMATOLOGICE ȘI METABOLICE

În acest grup patogenia este extrem de intricată. Pe primul loc, ca frecvență, se situează *talasemia homozigotă*, în care scurtarea duratei de viață a eritrocitelor circulante are un alt mecanism decât al celor din alte anemii hemolitice cu frecvență crescută, ca sferocitoza ereditară sau anemia hemolitică autoimună. În bolile amintite eritropoieza crescută este eficientă (cel puțin parțial), deși durata de viață a eritrocitelor circulante este scurtată. În talasemia homozigotă însă, eritroblaștii se încarcă cu o hemoglobină care este patologică și fără stabilitate în mica suspensie intraeritrocitară. Aceasta începe să precipite, alături de alte componente din structurile precursorilor eritrocitari care, nefiind capabili să matureze, mor *in situ* (eritropoieză ineficientă). De aceea, spre

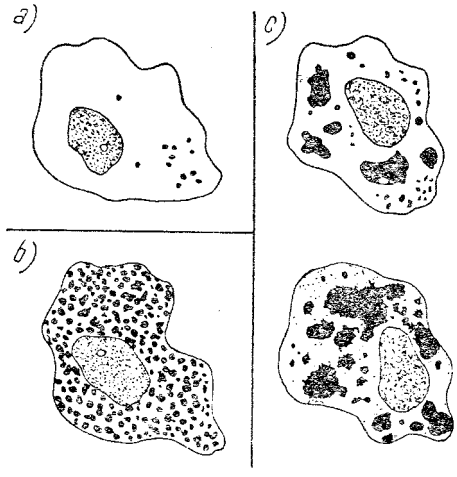


Fig. XXXVII.4. — Diferite forme de depozitare a fierului în celulele macrofage (sideromacrofage) (după Krauss și Merker).

Fierul feritinic și hemosiderinic se acumulează sub formă de grămezi de fier care, dacă ating un diametru de peste 0,2 μ, pot fi văzute la microscopul optic la colorația cu albastru de Prusia (metoda Perls). Particulele siderofile din macrofage pot avea dimensiuni diferite; în mod normal predomină cele cu diametru de 0,5—2 μ. Fierul de depozit din macrofage este predominant sub forma unor aglomerate mari ce pot atinge diametrul de 8 μ și chiar mai mult, stare în care devine greu mobilizabil (hemosiderină).

deosebire de cercetarea fierului medular din HG, în care nu se obțin informații esențiale, în talasemii colorația Perls arată că eritroblaștii prezintă perturbări de hemoglobinizare (cu acumulare de sideroblaști și siderocite), iar macrofagele conțin granulații importante de hemosiderină (fig. XXXVII. 4).

Eritrocitele mai conţin şi alte tipuri de incluzii ca de exemplu corpi Heinz alcătuiţi din hemoglobină instabilă precipitată. Incluziile rezultate prin precipitare de hemoglobină sunt alcătuite, mai ales, din sinteze asimetrice de monomeri desperecheaţi, cei mai instabili fiind tetramerii α care nu-şi găsesc perechile β. Ele se lipesc de membrana eritrocitară pe care o alterează. Pe lângă scăderea capacităţii de oxigenare se perturbă şi permeabilitatea membranei ce dezechilibrează pompa ionică. Prin aceasta eritrocitele îşi epuizează prococe resursele energetice cu care sunt alimentate când părăsesc măduva şi care nu mai pot fi refăcute după ce capacitatea lor de funcţionare a încetat. Splina contribuie în mare măsură la „aspirarea" granulaţiilor de fier şi a altor precipitate. După splenectomie, deşi dispare sechestrarea splenică, încetează şi rolul benefic al ei, de aceea numărul eritrocitelor şi al precursorilor eritrocitari din sânge, ce conţin astfel de precipitaţii, creşte considerabil, alături de cel al trombocitelor, care devine un alt pericol potenţial de complicaţii (1, 13, 24).

În afara talasemiei, în această categorie patogenetică de acumulare a fierului în organism, sunt cuprinse şi alte afecţiuni, ca *anemia aplastică* şi *aplazia medulară globală, sindromul mielodisplazic,* anemiile sideroblastice sau sideroacrestice. În unele forme de *ciroză hepatică* şi de *etilism cronic* este prezentă o hemosideroză, cu depunere de fier în special în celulele reticuloendoteliale. *Porfiria cutanea tarda* care aparţine acestui grup de boli a fost descrisă, cu unele detalii, la capitolul porfiriilor.

Profilaxie, tratament. O profilaxie reală, activă şi eficace se impune în condiţiile în care a fost descoperit un caz de tezaurizare a fierului între rudele, bărbaţi, care a depăşit vârsta de 15 ani şi a fost identificat ca suferind de HG. Teoretic, aproximativ 50% din aceşti subiecţi (bărbaţi sau femei) sunt purtători de tară sau bolnavi de hemocromatoză. Depistarea bolii cât mai precoce, deşi dificilă, este de mare utilitate, întrucât permite salvarea vieţii unor subiecţi heterozigoţi, iar a celor homozigoţi va putea fi apreciabil prelungită (25). Tratamentul bolii înainte de instalarea cirozei pare să prevină apariţia cancerului hepatic relativ frecvent în hemocromatoză. Mobilizarea fierului din ţesuturi şi eliminarea lui prin tratament, înainte de producerea leziunlor parenchimatoase ireversibile, are loc mai rapid în stadiile iniţiale. În stadiile avansate, când celulele au un conţinut masiv de fier, deplasarea lui este mai greu realizabilă, iar pe de altă parte celula care îl conţine se găseşte într-un stadiu morfofuncţional adesea depăşit. Incidenţa la femei este numai aparent mai scăzută prin faptul că pierderile menstruale au rolul unor emisii de sânge terapeutice, iar metroragiile unora devin, în aceste cazuri, un avantaj clinic. Se recomandă ca purtătorii potenţiali de tară să devină donatori de sânge voluntari, trimestriali (femeile poate mai rar) pentru a contribui la prevenirea acumulărilor de fier (25).

Tratament. Tratamentul are două obiective principale: evacuarea excesului de fier din organism şi tratarea bolilor asociate (diabet, cardiopatie, insuficienţă hepatică, insuficienţă endocrină etc.).

A. *Eliminarea* spontană a fierului fiind în disproporţie faţă de acumularea lui, trebuie să se recurgă, cât mai rapid, la metode care să inverseze acest echilibru. Ele sunt sângerările şi chelatorii de fier.

1. *Sângerările* prin venesecție constituie cel mai eficient spoliator al fierului depus. Un litru de sânge extras sustrage din organism 0,5 g de fier. Emisiile trebuie să fie ritmice și repetate, extinse pe o perioadă îndelungată cu scopul de a antrena din țesuturi cât mai mult fier de depozit. La stabilirea programului de sângerare trebuie să se țină seama de starea clinică a bolnavului. Când nu există alte contraindicații, se poate aplica următoarea schemă: emisii *de 500 ml* (ca doză de atac) la intervale săptămânale (sau chiar la 5 zile) până se ajunge la un nivel de Hb în jur de 11 g/100, apoi se trece la sângerări lunare, ținându-se seama de toleranța bolnavului și de criteriile sale biologice.

Ca plan general se urmărește evacuarea unei cantități de minimum 30 l de sânge, sau chiar mai mult, într-un interval pe cât posibil mai scurt, fără a altera echilibrul biologic al bolnavului. Realizarea acestui plafon minimal permite obținerea de ameliorări semnificative. La acestea nu se poate ajunge înainte de cel puțin doi ani, dar planificarea sângerărilor este bine să nu fie extinsă pe o perioadă mai lungă de 4 ani. Cât timp sângerările sunt suportate fără tulburări, ele trebuie continuate sub controlul hemogramei pentru a menține valori ușor sub cele normale: Hb 11 g/100 și feritinemia sub 50 μg/l. Instalarea acestei anemii relative se corectează destul de repede după întreruperea emisiilor. Bodin și Conte au evacuat 130 l de sânge în decurs de 7 ani (50—60 g Fe), iar Crosby, 55 l în numai 11 luni (circa 23 g Fe).

Odată depozitele de fier normalizate, fapt verificat prin determinarea feritinei și a transferinei, venesecțiile sunt spațiate la 2—3 luni interval, în scopul de a preveni reacumularea fierului.

Unul din dezavantajele emisiilor de sânge este spolierea concomitentă a organismului de proteinele plasmatice, efect cu atât mai grav cu cât acești bolnavi prezintă și un grad de insuficiență hepatică. Ficatul fiind producătorul principal de proteine, iar în hemocromatoză el nefiind capabil să le refacă în timp util, urmează ca plasma sanguină proprie să fie retransfuzată bolnavului. Cum 1,5 l de sânge conține circa 100 g de proteine, iar ritmul fiziologic de sinteză proteică este de 15—20 g/zi, retransfuzarea plasmei este indispensabilă pentru a se putea efectua terapia prin sângerări după unul din ritmurile descrise mai sus, fără a se prejudicia echilibrul existent al funcțiilor hepatice. Recoltarea sângelui de la bolnav se va face direct în flacoane de transfuzie cu conținut de substanță anticoagulantă și, după o sedimentare a hematiilor și evacuarea masei eritrocitare (care necesită un interval de minimum 2—3 ore, dacă nu se folosește o centrifugă adecvată), plasma sanguină proprie va fi retransfuzată. Prin această recuperare proteică nu se aduce nici un prejudiciu bolnavului sângerat.

2. *Chelatorii de fier* permit îndepărtarea prin urină a fierului depozitat. Ei rămân medicația principală când terapia prin sângerări nu poate fi realizată. Cei mai cunoscuți chelatori de fier sunt: EDTA (etilen-diamino-tetra acetat), DTPA (dietilen-triamino-penta acetat) și Desferal (deferoxamin metilat). Ultimul, cel mai folosit, formează cu ionul feric un complex ce se elimină prin urină. Teoretic, 100 mg Desferal fixează 8 mg de fier. Preparatul se administrează în cure prelungite, doza de atac este de 1 g/zi, iar cea de întreținere de 0,5 g zilnic, timp de mai multe luni. Calea cea mai uzitată este sub formă de injecții intramusculare. Este

obligatorie urmărirea în timp a hemosiderinei urinare care, după un interval de eliminare satisfăcător (20—50 mg), are tendință la diminuare. Pentru a mări extinderea în timp de eliminări ridicate, s-a recomandat administrarea Desferalului în perfuzie venoasă lentă prin denudare și aplicare de cateter. Preparatul poate fi administrat și subcutanat, la nivelul abdomenului, timp de 12—16 ore. Subcutanat este mai ușor de suportat deoarece nu imobilizează pacientul. În acest scop se folosește o seringă portabilă cu pompă. Ameliorările sunt mai evidente prin perfuzii continue. Pentru a proteja acțiunea chelatorilor, se utilizează și administrarea de vitamină C în doze ridicate. Printr-o eliminare medie de 15 mg de fier pe zi, se ajunge, eventual, la o eliminare de 5—6 g de fier pe an, ceea ce nu este mult față de acumulările crescute existente. Tratamentul cu Desferal are marele inconvenient că este greu de suportat. S-au făcut eforturi de a găsi un preparat chelator, asemănător ca efect cu cel administrat parenteral, care să poată fi administrat oral. Singurii chelatori orali (ca hidroxipiridonul) ar putea să devină, probabil, un tratament al viitorului.

Cu toată contribuția chelatorilor în eliminarea fierului, sângerările, cu reinjectarea plasmei proprii, rămân tratamentul de bază, cu adevărat eficient în hemocromatoze.

3. *Reducerea aportului de fier* printr-un regim care să nu conțină fier alimentar este considerată, de majoritatea autorilor, o măsură iluzorie, cunoscând și lipsa de gust și valoarea slab nutritivă a alimentelor lipsite, sau foarte sărace, în fier.

B. *Tratamentul bolilor asociate* va fi adaptat în funcție de tulburările prezente (diabet, endocrinopatii, cardiopatii, insuficiență hepatică etc.), Este indicat să se țină seama de unele prevederi practice. În caz de afectare hepatică se vor evita complet băuturile alcoolice: este de preferat și vaccinarea contra virusului hepatitei B. În stările de astenie va fi evitată medicația cu „antiastenice tonifiante" cu conținut de fier. În afectările osteoarticulare vor fi evitați corticosteroizii care pot agrava diabetul (16). Măsurile terapeutice trebuie adaptate, după caz, de la un pacient la altul. Dacă unele afectări organice produse de hemocromatoză sunt ameliorate prin tratamentul cu sângerări, altele cum sunt ciroza, neoplasmul hepatic și cele articulare nu sunt modificate de tratament.

BIBLIOGRAFIE

1. BECK W. S.: Hematology, Edit. 1991.
2. BRIDGES K. R., BUNN F.: În Harrison S. (ed.): Internal Med., vol. 2, Edit. International, 1992, 1518.
3. BRISSOT P., MOIRAND R., DEUGNIRE Y.: Presse Méd. 1991; 20: 1533.
4. BULIGESCU L., RIBET A. — Bolile ficatului, căilor biliare și pancreasului, Edit. Medicală, București, vol. 2, 897—930.
5. CONSSEMENT A., CONSSEMENT N., BEYLARD N.: Sem. Hôp. Paris 1987; 35—36: 2831.
6. DEISS A.: Semin. Hematol. 1983; 20: 81.
7. DEZIER Y. F., VERNET M.: Presse Méd. 1992; 27: 1283.
8. DAVIER A., PIERRE J. L.: Méd. Int. 1992; 99 (7): 50.
9. FINCH C.: În WILLIAMS W. J. (ed.): Hematology, Ed. McGraw-Hill Book Co., New York, 1983, 713.
10. HEHLMAN R.: Dtsch. Med. Wsch. 1985; 101: 848.
11. LINOMARK B., ERIKSSON S.: Acta Med. Scand. 1985; 218: 299.

12. PAWLOTSKY Y.: Presse Méd. 1993; 22: 1988.
13. PORTER J., GYAPARAKI M. și colab.: Blood 1988; 72: 1497.
14. PRUNESCU C., PRUNESCU P., VÂLCU A.: Morf. Embr. 1987; 33: 133.
15. SCHAFER A., MARION A.: New Engl. J. Med. 1985; 313: 1210.
16. SCILLIO Y.: Gazette Méd. 1992; 99: 44.
17. SIMON M., VONGSAVANTHONG J. și colab.: Sem. Hôp. Paris 1973; 49: 2125.
18. STANKOSKI J., ROTH J., GILLIN S.: Am. J. Gastroent. 1987; 82: 61.
19. VALBERG L., GENT C.: Ann. Rev. Med. 1985; 36: 27.
20. VÂLCU A.: În Berceanu Șt. (ed.): Hematologie Clinică, Edit. Medicală, București, 1976, 430.
21. VÂLCU A.: Eritrocitul, Edit. Medicală, București, 1977.
22. VOLKHOLZ H., SAILER D., RODL W.: Hepato-gastroent. 1984; 31: 289.
23. YAMMET P., CHRISTOFOROV B. și solab.: Sem. Hôp. Paris, 1987; 35—36: 2899.
24. POWELL L. W., ISSELBACHER K. J.: În HARRISON S. (ed.): Internal Med., vol. 2, Edit. International, 1992, 1825.
25. MOTULSKY A.: În Cecil: Textbook of Med., Ed. Saunders, 1992, 1132.

INDEX ALFABETIC*

A

AAL-sintetaza 882, 894
Abetalipoproteinemia ereditară 559
Abruptio placentae 834, 836
Absorbția fierului 105
Absența transcobalaminei II în ser 647
Acantocite 94, 97, 559
Acantocitoza 99, 706, 712, 728
— ereditară fără abetalipoproteinemie 729
— în abetalipoproteinemia familială 729
Accidente trombotice 737
ACE 384
Acetilanilida 804, 828
Acetilcolină 276
Acetilcolinesterază 211, 792
Acid acetilacetic 296
— acetilsalicilic 816
— aminolevulinic 883
— arahidonic 169, 224
— ascorbic 809, 816
— aspartic 896
— beta-hidroxibutiric 296
— citric 296
— clorhidric 644
— delta-aminolevulinic 616, 622, 625
— dezoxiribonucleic 488
— dihidrofolic 647
— dimercaptopropansulfonic 904
— dimercaptosuccinic 904
— epsilon aminocaproic 389
— etilic 296
— folic 24, 616, 620, 623, 630, 644, 671, 723, 767, 797
— formiminoglutamic 648, 658
— gama-aminobutiric 889
— glutamic 648
— lactic 296
Acid mefenamic 831
— 1-metil-4-imidazolacetic 176
— metil-malonic 657
— nalidixic 816
— oxalic 296, 659
— paraminobenzoic 804, 816
— piruvic 296, 816
— pteroilmonoglutamic 647
— retinoic 623
— tetrahidrofolic 647
— timidilic 655
— tranexamic 389
— uric 191, 297
— uridilic 655
Aciduria orotică ereditară 655
Acizi nucleici 630
Acrocianoza 875
Acromocite 92
Acromoreticulocite 92
ACTH 275
Activarea celulelor stem 505
— complementului 331, 346
Activatorul plasminogenului 101
Activitatea NK 240
ADCC 266
Adenilat-kinaza 712
Adenina 488
Adenozintrifosfataza 706
Aderența imunoglobulinelor 857
— opsonică 346
Adeziunea trombocitelor 218
Adiția genetică 755
ADN 488
— anormal 516
— polimerază 494
ADP 222, 223, 224
Afibrinogenemia 364, 522

* Index alfabetic alcătuit de dr. *IOAN JOCU*.

Agamaglobulinemia congenitală Bruton 160
Agamaglobulinemia legată de cromozomul X 528
Agranulocitoza 674
Agregarea trombocitelor 224
Albastru de metilen 809, 816
Albumine 299, 301
Alcool 654 896
Alcoolism 671
Aldolaza 706
— eritrocitară 806
Alfa-talasemia 798
Alelă 532
— HLA-A 909
Alele 487, 532,
Alelism mutagen 519
Allo-anticorpi 850
Allo-anticorpi anti-Rh 864
Allo-antigene 858
Alloimunizare 850
— de sarcină în sistemul ABO 879
— — — — — Rh 858
Allotipuri 435
Ametopterina 654
Amiloidoza renală 612
Aminofenazona 662
Aminopeptidaze 149
Aminopterina 654
Amoniac 297
Anafilotoxine C_{3a} și C_{5a} 347
Anapolon 682
Anasarca feto-placentară 863
Anchirina 82, 714
Androgenoterapia 623
Anemia Addison-Biermer 653
— aplastică 661, 672
— — congenitală 527
— Biermer 474
— congenitală Shahidi-Diamond 596
— Cooley 780, 786
— cu celule în semn de tras la țintă 780
— cu hematii în seceră 759
— cu hemoliză intravasculară 597
— Diamond-Blackfan 668, 672, 674
— din bolile cronicec 608
— — metastaze medulare 611
— diseritropoietică congenitală 524, 529, 597, 689
— — — tip I 691
— — — tip II 687
— — — tip III 694
— falciformă 759
— Fanconi 534, 546, 672
— feriprivă 575, 579, 611
— — idiopatică 585, 599
— — prin carență de fier 579
— — — deficit de fier 579
— hemolitică 629, 702
Anemia hemolitică autoimună 713, 868
— — congenitală nesferocitară 812, 819
— — cronică cu crize de hemoglobinurie paroxistică nocturnă 733
— — cu corpi Heinz 559
— — — hemosiderinurie perpetuă 733
— — din malarie 823
— — endoeritrocitară 705
— — ereditară 558
— — exoeritrocitară 705
— — extracorpusculară 705
— — imună 559, 846
— — indusă de alloanticorpi 858
— — — — medicamente 877
— — intracorpusculară 705
— — intravasculară anicterică 727
— — prin defect de membrană 712
— — — fragmentare eritrocitară 824
— — — medicamente 611
— — provocată de agenți chimici 823
— — — — — fizici 823
— feriprivă provocată de agenți infecțioși 823
— — mecanică la cardiaci 842
— — microangiopatică 833
— hipocromă 568
— — hipersideremică 614
— — prin deficit în sinteza protoporfirinei 614
— macrocitară normocromă 558
— macromegaloblastică de sarcină 652
— mediteraneană 780
— megaloblastică 623, 630
— — cu răspuns la tiamină 655
— — după rezecție gastrică 644
— — în afecțiuni gastrice primitive 646
— — prin consum crescut de folați 652
— — — deficit de acid folic 647, 649
— — — — — vitamina B_{12} 625
— — — — nutrițional de folați 659
— — — tulburări de depozitare a folaților 653
— — — — — tranzit a vitaminei B_{12} 647
— — — — — utilizare a folaților 654
— microcitară hipocromă 557
— mieloftizică 611
— normocitară normocromă 558
— pernicioasă 636
— — juvenilă 646
— post-hemoragie acută 696
— prin deficit de cupru 607
— — — în sinteza hemoglobinei 568
— — diluție 611
— refractară 655, 671
— — sideroblastică idiopatică 621
— sideroacrestică 614
— sideroblastică 559, 572, 597, 614, 694, 905

Anemia sideroblastică congenitală 617
— — din boli infecțioase 627
— — — hemopatii maligne 627
— — — neoplazii de viscere 627
— — idiopatică dobândită 617
— — legată de sex 617
— — secundară 617
— sideropenică 904
Aneuploidie 534
Anevrism aortic 834
Angiocolită 719
Angioedem ereditar 519
Angiogeneza 174
Angiotensina 384
Anilina 804
Anizocitoză 817
Anizopoikilocitoză 790
Anomalia congenitală Adler 162
— May-Hegglin 162, 212, 227, 229
— Pelger-Huët 162, 529
Anomalii cromosomiale 534
— — numerice 534
— — structurale 534
Anorexie 915
Anoxie 806
Antibody dependent cell mediated cytotoxicy 266
Anticoagulante 379
Anticoncepționale 654
Anticonvulsivante 654
Anticorpi aglutinați 855
— anti-A (α) 408, 849
— anti-B (β) 408, 849
— anti-A și anti-B 849
— anti-colagen 613
— anti-C.P. 639, 640
— anti-Duffy 860
— anti F.I. 639
— anti-Kidd 431, 860
— anti-Lewis 414
— anti-Lutheran 431
— anti-MN 860
— anti-Rh 860
— anti-S_3 424, 860
— anti-trombocitari 434
— cu acțiune hemolizantă 851
— circulanți 271
— IgA 259
— Ig D 259
— Ig E 259
— imuni 849
— naturali 849, 858
— neaglutinați 855
— monoclonali 15, 211, 506
— sistemului Duffy 430
— — Ii 432
— — Keel 429
— — Rhesus 421
— — P 426
Anticorpi specifici pentru antigene eritrocitare 846
— — — medicamente 846
Antigenele 271
— CREG 481
— eritrocitare 847
— de diferențiere limfocitară 238
— de suprafață 184
— HLA 445
— — clasa I 447
— — — II 450
— — — III 457
— — și imunizarea materno-infantilă 466
— — — transfuzia de sânge 465
— — — transplantarea de organe 467
— Ii 848
— P(Tja) 849
— sistemului OAB 406
— — Rh 848
Antifactorii coagulării 383
Antifolice 653
Antimalarice 650
Antimetaboliți 662
Antimitotice 662
Antipirina 824, 828
Antistin 800
Antitrombina I 379
— II 379
— III 217, 380, 395
Anulocite 93, 569
Anurie 738
Aparatul Golgi 148
Apendicita acută 890
Aplazia medulară 59
— — medicamentoasă 64
Apoproteine 298
Apoptoza 62
Area vasculosa 57
Areflexie tendinoasă 891
Arginaza 192
Arilsulfataza 169, 173, 184
ARN-mesager 491
Arsuri severe 559
Artrita juvenilă 474
— reactivă 473
— reumatoidă 174, 474, 475, 623
Ascită 176
Asincronism nucleocitoplasmatic 630
Aspatofort 894
Aspergillus fumigatus 902
Aspirină 229, 582, 842
Asplenie congenitală 160
Ataxia spinocerebeloasă 477
Atebrin 662, 816
Ateroscleroza 174
Atransferinemia congenitală 112, 529, 596, 597, 605
— secundară 606
Atrofia nervului optic 642
Atrofii musculare 691

Azathioprina 618, 623, 637, 673
Azot mustar 623
— neproteic 297
Azulfidin 816
Auto-anticorpi la cald 871
— — — rece 871
Autosomal 532

B

Babesia microti 824, 827
Bactericidie 155
Bacteriofagi 502
BAL 816, 830, 904
Balanța fierului 104
Bartonella baciliformis 706, 824, 827
Bartonelază 563
Baze pirimidinice 488
— purinice 488
Bazofilia 174
Benzen 662, 663, 828
Benzocaină 804
Beta-glucuronidază 169, 184
Beta-talasemia 780, 784, 787, 793
Beta-tromboglobulină 960
Bilirubină directă 703
— indirectă 143, 703
— liberă 142
Bilirubinat de calciu 719
Biliverdină 142
Bird Shot Retinopaty 473
Bleomicină 836, 841
Blotting 499
Biseptol 682
Boala Abt-Letterer-Siwe 199
— Addison 167, 465
— Addison-Biermer 631, 636
— Albers-Schönberg 200
— Basedow 474
— Behçet 473, 476, 480
— celiacă 474, 475, 612, 651
— Crohn 638
— cu aglutinine la rece 875
— Cushing 276
— Fabry 524, 529
— Gaucher 200, 524, 529, 671
— granulomatoasă cronică 528
— grefă-contra-gazdă 797
— grupului eritrocitar Rh nul 713, 731
— „Hb B" 799, 801
— hemolitică a nou-născutului 706, 862
— Hodgkin 167, 276, 473, 553 623
— Krabbe 324, 529
— Letterer-Siwe 671
— membranelor hialine a nou-născutului 396
— Minkowsky-Chauffard 94, 713
— Miyasato 394
— Niemann-Pick, 524, 529, 671
— pseudo von Willebrand 228
Boala Rietti-Greppi-Micheli 787
— Sandhoff 524, 529
— Tay-Sachs 524, 529
— tromboembolică cronică 306
— ulceroasă 174
— von Willebrand 365, 524, 529
— Waldenström 611
— Wilson 607, 829
— Wolman 524, 529
Boli hematologice cu ereditate autosomală dominantă 518, 523
— — — — — recesivă 521, 523
— — monogenice 517, 529
— — poligenice 517, 529
— mieloproliferative 653
Bordelia recurentes 824
Bruceloză 276, 671
Burr cells 94
Bursa Fabricius 16, 18, 20, 232
By-pass cardiopulmonar 229

C

Calea acidului arahidonic 220
— Embden-Mayerhoff 122
— fosfoinozitidelor 220
Calmodulin 360
Cancer cecal 554
— gastric 559, 583, 637, 643
— hepatic 896
— mucosecretant 710
— nasofaringian 473
— renal 476
Capacitatea lentă de fixare a fierului 109
— totală de legare a fierului 916
Caracter dominant 517
— recesiv 517
Carbenicilină 676
Carbimazol 662
Carbohemoglobină 141
Carboxihemoglobină 140, 807
Cardiopatia în hemocromatoză 914
Cardiopatii congenitale 517
Cariotipul uman normal 534
Carotenoizi 888
Catabolismul hemoglobinei 141
— imunoglobulinelor 324
— proteinelor complementului 330
Catalaze 116
Catecolamine 275
Catepsina 184, 192
— G 154
Cauzele methemoglobinemiei 804
— pancitopeniilor 671
Cefaline 296, 828
Cefalosporina 229, 681, 830
Cefatrexil 681
Cefobid 682
Ceftazidima 682
Ceftriaxona 682
Celule adipoase din măduvă 37
— cu „văluri" 189

Celule de însoțire Türck 234, 277
— „doică" 21
— endoteliale 37, 179
— formatoare de colonii în splină 30
— — — — mixte 31
— Gaucher 786
— hematopoietice 28
— — progenitoare 28, 32
— — stem 28
— — — pluripotente 16, 30, 53
— „interdigitate" 188
— K nespecifică 266
— Kupffer 178, 854, 855
— Langerhans 187
— „litoral" din splină 187, 197
— medulare CD 31
— mezangiale din rinichi 187
— „Mott" 234, 277
— NK 19, 260, 263, 265
— parietale gastrice 609
— primordiale ale sângelui 30
— progenitoare ale limfocitelor T 36
— — bazofile 35
— — eozinofile 35
— — eritroide 33
— — granulomonocitare 33
— — limfoide 32
— — limfopoietice 36
— — megacariocitare 35
— — mieloide 32
— — tardive 31
— — timpurii 31
— reticulare 178
— reticuloendoteliale 178
— Tc 265
— stem eritroide 610
Centimorgan 532
Centroblaști 233
Centromer 532
Ceruloplasmină 571
Cheiloză 590
Chelatori 830, 904
— de fier 620, 796, 922
CHEM 556, 557
Chimaza 169, 176
Chilomicroni 298
Chinidină 706, 816, 824, 828, 830
Chinină 824, 826
Chlordone 662
Chlorphenazone 662
Ciancobalamine 631
Cianoză 805, 806
— albastră-cenușie 806
— roșie-violacee 806
Ciclofosfamidă 673, 674
Ciclokapron 389
Cicloserină 623, 654
Ciclosporina A 684, 839
Ciclul de viață al bazofilelor 170
— — — — granulocitelor 150
— — — — monocitelor 185
Ciclul de viață al trombocitelor 203
— Embden-Meyerhoff 812
— fierului 108
C-kit ligand 40
Cimetidină 176
Cinetica eozinofilelor 165
— hematopoezei 52
— neutrofilelor 150
Ciroza alcoolică 559
— biliară 474
— hepatică 638, 653
— pigmentară 913
Cisplatina 834, 837
Citocromoxidaza 116
Citocromul A 883; B 883
— C 116, 883
— P^{450} 883
Citodiabaza 17, 24
Citogenetica în hemopatii maligne 539
Citokine 40, 70, 173, 192, 194, 839
Citoliza 346
Citomegalovirus 662, 665
Citosin-arabinosid 637, 655
Citoskeleton 214, 222
Citostatice 276, 623, 624
Citozina 488
Clasificarea anemiilor hemolitice 705, 706
— — — autoimune 871
— — hipocrome 573
— — sideroblastice 617
— morfologică a anemiilor 558
— patogenetică a anemiilor 758
Clindamicină 681
Clonarea moleculară 500, 501
Clonă 506
Clorambucil 876
Cloramfenicol 623, 624, 662, 663, 664, 816, 824, 828
Clorați 824
Clordelazin 662, 898
Clorfeniramin 176
Clorochina 804, 816, 901, 902
Clorofila 883
Cloroform 824, 828
Clorpromazina 706, 824, 830, 831
Cloroza 599
Clostridium Welchi 824, 827
Coagulare intravenoasă diseminată 227, 706, 737, 826, 833, 834, 835
Coagulopatie de consum 671
— ereditară 621
Coarctație de aortă 843
Codocite 92, 93
Codominant 532
Codominanța genelor HLA 444
Codul genetic ARNm 750
Colagen 213, 215, 217, 219
Colagenază 191
Colagenoze 623

Colagoge 723
Colaps 719, 738, 888
Colchicină 638, 662
Colecistectomie 797
Colecistită calculoasă 719
Colelitiază 707, 797
Coleretice 723
Colesterol 128, 296
Colestiramina 888
Colică hepatică 719
Colita ulceroasă 174, 782
Coloidopexia 178
Colony forming units 30
Coloraţia Perls 670, 920
Compartimentul depozitelor de fier 577
— fierului circulant 577
Complexul amigdalian 275
— major de histocompatibilitate 438, 441
Complotipuri 460
Compoziţia plasmei 285
Concentraţia fierului seric 178
— medie a Hb în eritrocite 556
Concepţia dualistă 14
— monofiletistă 14
— polifiletistă 14
— unicistă Maximow 16, 25
— unităţii ţesutului sanguin 16
Condrocalcinoza 915
Condroitinsulfat 173
Consanguinitate 532
Constanţa de sedimentare S 303
Constituenţi organici al plasmei 296
Controlul granulopoezei 197
Conţinutul în fier al unor alimente 587
Convertază a angiotensinei 191
Convulsii 864
Coproporfirina ereditară 529
Corelarea antigenelor HLA cu unele boli 471
Coronaropatie 517
Corpii denşi 229
— Gall 235
— Heinz 94, 95, 775, 803, 807, 822
— Howell-Jolly 74, 95
— în „rachetă" Birbeck 199
— Jolly 791, 817
— mamilari 275
— Russell 234, 235, 247
— Weibel-Palade 285
Corticosteroizi 176, 682, 873, 874
Corticoterapia 614
Cortizon 602
Coproporfirină 829
Coproporfirinogen oxidaza 893
Cosmide 501, 502
Craniu „în perie" 789
Creatină 297
Creatinină 297
Crezol 662
Cristale Charcot-Leyden 158
Crize aplastice 719
— comiţiale 892
— de deglobulizare 719
— granulocitare 645
— hemolitice 719
— megaloblastice 719
— reticulocitare 645
Cromatidă 532
Cromatină 495
Cromatografie 304
Cromosom 487, 515, 532
Cromosomul Ph 31, 540
— X 611, 616, 617, 815
— 5, 52
— 6, 441
Crossing over 532
Cupru 829
Cytosin-arabinoside 623

D

Dacriocite 559
DAF 335, 693, 735, 736
Danazol 623, 873, 874
Dapsone 804, 816
Daunorubicina 837
Decriptarea 492
Defecte extrinseci neutrofilului 163
— intrinseci neutrofilului 162
Defensine 154
Deferoxamină 604, 796, 922
Defibrinarea terapeutică 395
Deficienţa de LCAT 558, 706
— — glucozo-6-fosfat dehidrogenază 161
— — mieloperoxidază 161
— Hageman 367
Deficienţele fibrinolizei 396
Deficit de adeziune leucocitară 162
— — α-cetoglutarat dehidrogenază 655
— — ciclohidrolază 654
— — coproporfirinogen oxidază 616, 618, 620
— — cupru 577
— — decarboxilază 616,
— — delta-aminolevulinat sintetază 616, 617, 618, 621, 655
— — enzime din ciclul Embden-Meyerhoff 821
— — FA_2 — reductază 660
— — factor F. Stuart-Prower 366
— — fier 571
— — F I 522
— — F V 522
— — F VII 522
— — F VIII 527, 529
— — F IX 527, 529
— — F X 522,
— — F XI 522
— — F XIII 523
— — formiminotransferază 655

Deficit de fosfogliceratkinază 528, 529
— — G_6PD 528, 529
— galactozo-fosfat-uridil-transferază 813, 876
— — hemisintetază 616
— — hidroxilază 473
— — hipoxantin-guanin-fosforibozil-transferază 655
— — IgA 474
— — malonil-CoA-mutază 647
— — metil-transferază 647, 654
— — piruvatkinază 522, 529, 818
— — uroporfirinogen 616
— — vitamina B_{12} în boli intestinale 646
— eritrocitar de piruvatkinază 819
Degenerescența axonomielitică 889
— hepatolenticulară 829
Deleția 755
Densitatea optică 865
Depozite de fier ale organismului 113
Dermatansulfat 173
Dermatita herpetiformă 474
Dermatite cronice 653
Dermatomiozita juvenilă 474
Deseril 831
Desferal 604, 768, 796, 922
Desferioxamină 604, 768
Dezlipire prematură de placentă 411
Dezoxiadenil-cobalamina 638
Dezoxiuridina 657
Dextran 229, 699, 842
Diabaza 73
Diabet bronzat 914
— insulino-dependent 473, 474
— zaharat 655
Diabinese 662
Diaforaza 805
Diamox 662
Diazepam 898
DDT 662
Difenilhidantoina 654
Diferențierea celulară 23
— limfocitelor B 243
— — T 247
Difosfogliceromutaza 821
Digitonina 828
Dipiridamol 842
D-penicilamina 473, 626, 904
DMPS 910
DMS 904
Dimercaptopropanol 816, 904
Dimeri α, β 704
Dimorfism eritrocitar 569
Diseritropoieza 559, 561, 616, 689
Disfagie 589, 590
Dispnee 705,
Distonie neurovegetativă 892
Disfibrinogenemia congenitală 518, 529
Diverticul Meckel 584
Diverticuloza 582
Divicină 818
Dominant 532
Dopamina 861
Dopul hemostatic primar 216
— — secundar 216
Drepanocite 94, 559
Drepanocitoza 93, 99, 563, 759
DPTA 768, 922
Duplicație 532
Durata de viață a eritrocitelor 98
— — — — limfocitelor 254
— — — — trombocitelor 209
Dureri abdominale inexplicabile 890

E

Echilibrul de membrană Donnan 293, 294
— osmotic 292
— proteic 314
Echinoacantocite 93
Echinocite 94, 559
Eclampsie 710, 834, 837
Edem pulmonar 826, 863
Ederen 662
Edetamin 904
EDRF 384
EDTA 604, 624
EDTA-calciu 904
Efectul Bohr 140
— glucoză 896
Efitard 662
ELAM 256
Elastază 149, 191, 214
Electroforeza 304
— Hb 764, 793
Electroliții plasmei 288
Eliptocite 92, 558, 817
Eliptocitoza 558
— Barcelona 724
— ereditară 523, 563, 706, 723
Emetiral 662
Emperipoleză 211
Encefalita rujeolică 469
Encefalopatia saturnină 904
Endocitarea 155
Endonucleaze 495
— de restricție 496
Endoteliom 384
Enhancers 491
Enterita după iradiere 583
Enteropatia glutenică 612, 638, 651
Enteropatii exsudative 607
Enzime cu fier 104, 105
— eritrocitare 83
— heminice 106
— în plasmă 310
— lizosomale 184
Enzimopatii eritrocitare 812
Eozinofil nesegmentat 164
— segmentat 164
Eozinofilia 166
Eozinopenia 168

Epilepsia 642
Epinefrina 217, 602
Epistaxis 669
EPLF 384
Ereditatea autosomală dominantă 517
— — recesivă 517
— codominantă în hematologie 519
— dominantă legată de cromosomul X 525
— mendeliană 516
— monogenică 516
— recesivă legată de cromosomul X 526
Ergastoplasma 526
Eritremie cronică 622
Eritroblast 17
— bazofil 17
— „feripriv" 594
— oxifil 17
Eritroblastemie 863, 865
Eritrocite 18
— „ciupite" 93
— crenelate 94
— cu aspect de bilă 730
— — — — gogoașă 730
— — corpi Jolly 559, 830
— excavate 93
— falciforme 559
— fragmentate 559, 833
— hipocrome 92
— „în agonie" 97
— — coajă de castană 94
— — fișicuri 762
— — formă de cupă 559
— — — — pinten 94
— — picătură 97, 559
— — roată dințată 94
— — „șaibă" 93
— — seceră 94, 559
— — semn de tras la țintă 93, 558, 708
— — spin 94
— matur 17
— policromatofil 17
Eritrodonție 886
Eritroleucemie acută 695
Eritron 68
Eritropoetina 191, 208, 811
Eritropoieza 68
— ineficace 689
Erythroid Burst Forming Unit 69
— *Colony Forming Unit* 69
Escherichia coli 824
Esteraze 191
Etanol 623, 624
Etilism cronic 559
Etiologia carenței de fier 582
Eucariot 532
Evidențierea anticorpilor fixați pe eritrocite 855
Exoni 491
Explorarea sistemului complement 349
Expresivitate 532
Exsanguinotransfuzie 809, 819, 865, 866
Extrasistole 795

F

Facies mongoloid 789
Factorii antifibrinolitici 389
— de creștere hematopoietici 685
— inhibitori ai hematopoiezei 51
— — plachetari în coagulare 360, 361, 364
— profibrinolitici 389
Factorul activator plachetar 172
— B 191
— BF(B) 458
— C2 459
— C4 459
— chimiotactic al eozinofilelor 172
— — — neutrofilelor 172
— D 191
— de angiogeneză 192
— — creștere a fibroblaștilor 50
— — — ai hematopoiezei 69
— — — — limfocitelor B 42
— — — — — T 41
— — — — monocitelor 42
— — — insulin-like 23
— — necroză tumorală 23, 49
— Hageman 173
— inhibitor al leucemiei 49
— intrinsec Castle 635, 639, 640
— nefritic (C_2NeF) 328
— plachetar 4, 51, 223
— stabilizator al fibrinei 377
— stimulator al celulei stem 40, 41
— — — coloniilor granulocitare 22, 41
— — — — granulomonocitare 22, 41
— — — limfocitelor B 42
— — — macrofage 22
— — — mastocitelor 41
— — — — monocitare 41
— Stuart-Prower 527
— veninului de cobra 338
— von Willebrand 204, 218, 357, 384, 838
Fagocitina 167
Fagocitoza 153, 169, 178
— complexelor imune 346
Fagolisosomi 185
Fagosomi 154
Fasciita eozinofilică 167
Fasolea „fava' 824, 829
Fazele ciclului mitotic 22
— eritrofagocitozei 98
Febra „anemică" 543
— bilioasă hemoglobinurică 826
— de apă neagră 826
— — Oroyo 827
— Q 671
Fehinizon 662

Fenacemid 662
Fenacetina 746, 804, 816, 824, 828, 830
Fenilbutazona 662, 663, 664
Fenilhidrazina 804, 824, 828
Feniramin 662
Fenitoin 762
Fenobarbital 654
Fenomenul de adeziune celulară 346
— — *crossing over* 488
— — *linkage* 487
— — marginație 19
— — respingere a grefei 467
Fenotiazine 559
Fenotip 397
Fenotipul Bombay 848
— de „sludge" 762
— HLA 446
— imun 237
— Ko 427
— McLeod 428
— Rh pe celule fetale 865
Fer glurom 601
Feritina 104, 106, 113, 594, 609, 916
— eritrocitară 595
Feritinemia 916
Ferochelataza 618, 625, 663, 796
Ferocianura de potasiu 707
Ferokinetica 117
Feroterapia 742
Ferro Gradumet 601
Ferrum Haussmann 601
Fetoscopie 865
Fibrinaza 377
Fibrinogen 214, 217, 224, 297, 301, 374
Fibrinoliza 353, 386
— chirurgicală 393
— fiziologică 390
— mecanism 386
— medicală 693
— obstetricală 393
— și reparația țesuturilor 399
— — sistemul kininelor vasculare 399
Fibrinopeptida A 374
Fibroblaste 21, 37
Fibrocite 179
Fibronectina 191, 214, 217, 219
Fibroze pulmonare 174
Fier circulant 109
— de depozit 113
— dextran 602
— din alimentație 105, 586
— heminic 104
— neheminic 104
— polimaltozat 602
— tisular 116
Fingerprint 807
Fitohemaglutinina 253
Fiziopatologia deficitului de fier 589
— hemoglobinopatiilor 756
— siclemiei 760, 761
— talasemiei 785
Fluorocite 886
5-Fluorouracil 637, 655
Fluximesteron 682
Fluxul informației în celulă 490
Folați 646, 648, 651
Fosfataze 191
— acide 149, 184, 792
Fosfatide 296
Fosfofructokinaza 706, 821
Fosfoglicerokinază 125
Fosfogliceromutaza 821
Fosfolipaza A_2 220
— C 220
Fotodermatoză 885
Fotosensibilitate 901
Fototerapie 866
Fracturi osoase 795
Fragilitatea eritrocitelor 717
Fragmentarea mecanică a eritrocitelor 739
— osmotică a eritrocitelor 739
Fragmente active în inflamație 354
— de restricție 495
Fumarat feros 601
Funcțiile eritrocitelor 85, 256
— granulocitelor bazofile 170
— — eozinofile 165
— — neutrofile 155
— hemoglobinei 139
— macrofagelor 190
— mastocitelor 175
— medulare 70
— plasmocitelor 256, 307
— proteinelor plasmatice 307
— timusului 249
— trombocitelor 215, 226
Furazolidon 816, 824, 828
Furosemid 861
Fuziunea de gene 755

G

GABA 889
Galactokinaza 812
Gamabenzen hexaclorid 662
Gama-glutamil-cistein sintetaza 821
Gamapatie monoclonală IgA 612
Gameți 515, 532
Gangliosidoza GM_1 524, 529
Gastrita alcoolică 581
— atrofică 637, 639
— bontului 637
— hemoragică 581
— medicamentoasă 581
GAT 684
Gelatina Wharton 866
Gena $ALAS_2$ 616
Gene 487, 532
— alelice 517
— care controlează complementatul 481
— localizate pe cromosomul G 441

Gene mutante 516
— non-alelice 517
Genele sistemului HLA 440, 441
Genetica hemoglobulinopatiei 746
— în diagnosticul hemopatiilor maligne 505
— proteinelor complementului 330
Genotip 487
— HLA 446
Genotipuri în sindromul β-talasemiei 788
Gentamicină 681
Gingivoragii 669
Glandele Lieberkühn 641
Gliadină 648
Glicină 616
Glicocalix 212
Gliceforina C 724
Glicoforine 82
Glicoproteine 212, 298
Globina 131
Globuline 299, 301
— antitimocitare 684
— α_1 299, 301
— α_2 300, 301
— β 300, 301
— γ 300, 301
Glomerulonefrita acută 836
— cronică 613
Glosita Hunter 641
Glubifer 601
Glucocerebroside 199
Glucosteroizi 276
Glucozo-6-fosfat dehidrogenaza 125, 706, 792, 809, 812
Glucozo-fosfat izomeraza 786
Glutation 125, 191, 805, 818
Glutation-peroxidaza 706, 821
Glutation-reductaza 706
Glutation-sintetaza 706, 821
Granulații azurofile 148
— α (alfa) 223
— bazofile 95, 169
— δ (delta) 223
— „primare" 148
— secundare 148
— „terțiare" 148
— „toxice" 148
Granulocit adult 17
— tânăr 17
Granulocite bazofile 19, 168
— eozinofile 19, 163
— neutrofile 19, 146
Granulomatoza cronică familială 160
— Wegener 836, 839
Granulomul eozinofilic 166, 199
Granulopenie 631
Grefa cardiacă 469
— de ficat 469
— — plămân 469
Grupele lipoproteinice 436
— sanguine 404
Grupele trombocitare 433
Guanină 488
Guanosină 191

H

Haemophilus influenzae 824
Hairy cells leukemia 64, 239
Halucinații 642
Haplotipuri HLA 444, 446
Haptoglobine 191, 704
Haptoglobuline 434
Haptoglobulinemie 861
HDL 298
Hem 179, 882, 883
Hemagioendoteliom hepatic 836
Hemangiom 710
— cavernos 836
Hemangioblaști 57
Hematii crenelate 559, 828
— cu inele Cabot 791
— — punctații bazofile 792
— în pălărie mexicană 791
Hematină 105, 899
Hematocrit 87, 556
Hematopoieză 17, 27
— embriofetală 57
— hepatică 58
— splenică 59
Hematozoarul palustru 823, 824
Hemină 105, 141
Hemisintetază 618, 621, 625, 629
Hemobilie 584
Hemocromatoză 112, 909
— ereditară 909
— genetică 909
— idiopatică 473, 478, 524, 529
— în unele boli hematologice 920
— — — — metabolice 920
Hemocromatoze secundare 795, 912, 919
Hemodializă 809
Hemofilia A 365, 517, 527
— B 366, 517, 527
Hemoglobină 83, 87, 106, 131
— A 756, 777, 799
— A_1 137
— A_2 138, 746, 749, 799, 829
— B 63
— B_2 756
Hemoglobinemia 562
Hemoglobine anormale 776
— eritrocitare 556
— fiziologice 137, 799
— instabile 772
Hemoglobinopatia C 751, 768, 769
— D 769
— E 770
— F 747, 756, 776, 794, 799, 824, 862
— H 138, 828
— M 808

Hemoglobinopatia O 746, 759, 760, 771
— S 759
Hemoglobinopatii calitative 745
— cantitative 745
Hemoglobinoza 563, 708
— C 558
— M 706
— S 558, 759
Hemoglobinuria 562, 707,
— de marş 559, 706, 712, 727
— paroxistică *a frigore* 709, 875, 877
— — nocturnă 227, 585, 662, 695, 706, 728, 733
Hemoliza 96, 702
— extravasculară 99, 562, 702, 704, 825, 852
— intravasculară 99, 562, 698, 703, 825, 852
— la cardiaci 483, 484
— medicamentoasă 829
— normală 702
— patologică 99, 702
— posttransfuzională 858
Hemolizine 827, 851
Hemopatii maligne 560
Hemopexine 704
Hemoptizie 585, 612, 826
Hemoragie cerebrală 603
— retiniană 669
Hemoroizi 382
Hemosiderină 106, 115, 705, 911
Hemosiderinemia 562
Hemosideroza 795, 911, 912, 919
— idiopatică 528
— pulmonară 596, 611
Hemostaza 353, 354
— primară 202, 216
— secundară 216
HEMPAS 686, 692
HIN 623, 624
Heparină 169
Heparinoterapia 862
Hepatita acută virală 664
— cronică activă 474
Hepatomegalie 176, 797, 913
Hepatosplenomegalie 619, 621, 622, 863
Hernie hiatală 582
Heterocromatina 490
Heterogenitatea imunoglobulinelor 314
— trombocitelor 206
Heterozigot 517, 532
Heteroimunizare 849
Hexaclorid 662
Hexosaminidaze 191
Hexokinaza 125, 706, 821
Hibridare moleculară 498
Hidantoina 654, 824, 831
Hidratare parenterală 861
Hidrazida acidului izonicotinic 624
Hidrocarburi aromatice 662
Hidrogen arseniat 839
Hidroxiuree 637, 655
Hidroxocobalamina 633, 644
Hiperbilirubinemia indirectă 536, 703, 705, 861
Hipercoagulabilitate 737
Hiperdiploidie 534
Hiperplazie eritroblastică 631
— eritroidă 560
Hiperreticulocitoză 561
Hipersensibilitate de tip întârziat 260
Hipersideremie 614, 915
Hipersplenism 559, 671, 706
Hipertensiune arterială 517, 892
— — malignă 710, 834, 837
— — pulmonară 612
— portală 176
Hipertiroidie 276, 638
Hipertricoză 900
Hipertrombinemie 364
Hipocamp 275
Hiporcromie 559, 568, 623
Hipodiploidie 534
Hipofibronogenemie 364, 522
Hipofizectomie 275
Hipofosfatemie 559
Hipogonadism 790, 914
Hiponatremie 891
Hipostenurie 764
Hipotensiune posturală 892
Hipoxie 762
Histamina 50, 172, 173
Histiocite 179
Histiocitoza malignă 200
— X 199
Histiocitoze 180
— cu celule Langerhans 199
— — — non-Langerhans 199
— — încărcare lipidică 199
— inflamatorii 199
Histoplasmoză 560
Homeostazia hemostazei 353
Homocisteină 657
Homozigot 517, 533
Hormon antidiuretic 891
— androgen 611
— stimulativ tiroidian 275
HPN 733
Hydrops foetalis 779, 863, 866

I

Icter 716, 762
— Criggler-Najjar 705
— familial 705
— Gilbert 705
— nuclear 820, 864
IDL 298
Ileus dinamic 891
Implicaţii medicale ale sistemului HLA 465
Importanţa sistemului Rhesus 402
Imunizarea anti-Rh 859
Imunoblaşti 233

Imunoelectroforeza 305
Imunofenotipare 506
Imunoglobuline 312, 873
— A 301, 318
— alotipice 315
— G 301, 317
— idiopatice 315
— izotipice 315
— M 301, 320
Imunosupresoare 59, 614
Inactivarea X 527
Incompatibilitate feto-maternă 862
Indice de paternitate 470
— reticulocitar 77
Infantilism 790
Infarct 603
— mezenteric 893
— pulmonar 612, 613, 763
Infecție sinusală 795
— cu botriocefal 637, 646
Inflamație acută 195
— cronică 195
Influența factorilor coagulării asupra sistemului fibrinolitic 403
— sistemului fibrinolitic asupra factorilor coagulării 400
Inhibitorul Frey 390
— Kuntz 390
Iniprol 390
Insuficiență cardiacă 612, 640, 762, 766
— medulară 561
— renală 622, 654, 766
Insule Cabot 95, 889
— Wolff și Pander 57
Insulina 525, 830
Integrine 217
Interesul sistemului HLA pentru medicina legală 470
Interferon 152, 188
— γ 23, 49
Interleukine 15, 22, 40, 44, 45, 46, 47, 48, 152, 261, 610
Intoxicația acută cu fier 604
— cu plumb 903
Introni 491, 751
Investigația metabolismului bazal 574
Iradierea 638, 664
Izoantigeni naturali 860
Izoimunizare 796
Izoniazida 654, 824, 828
Izouramil 818

K

Kala-azar 826
Kalicreina 154, 160, 173
Kariorexie 689
Keflin 681
Keratocite 92, 833
Kerosen 662
Ketotifen 176
Kininogeneza 400
Knitocite 93
Koilonichie 590, 603

L

Lacrimocite 92
Lactatdehidrogenaza 818, 820
Lactoforina 148, 610
Laminina 215, 219
Largactil 898
Large granular lymphocyte 19
LBS 388
Lecitina 303
Lecitinoza 827
Lecitin colesterol aciltransferaza 558, 706
LDL 298
Legea complementarității bazelor 489
— Watson-Crick 489
Legionelloza 671
Leiomioame 583
Leishmanioza donovani 824
— indiană 827
— infantilă mediteraneană 827
— viscerală 827
Leptoanulocite 93
Leptocite 93
Leptocitoza ereditară 780
Lepra tuberculoidă 473, 474
Leucemia 394, 671
— acută 506, 564
— — limfoblastică 63, 547, 578
— — mieloblastică *de novo* 541
— — — indusă de terapie 541
— — mieloidă 622
— — promielocitară 710, 834, 836
— cronică 62
— — granulocitară 229, 539, 616
— — limfatică 474, 551
— cu celule *Hairy* 198
— — — păroase 239, 560, 671
— — eozinofile 167
— — mastocite 177
— granulocitară 551
— plasmocitară 551
Leucocite 18, 19
Leucodistrofia metacromatică 524
Leucomax 200
Leucopenie 622, 739
Leucotaxia 155
Leucotriene 50, 155, 160, 173, 191, 194
Leucovorin 655, 658
Levomepromazina 898
Lidocaina 804
Limfoadenopatia angioimunoblastică 167, 507
Limfoame 623
— foliculare 550
— Hodgkin 671
— limfobastice 506

Limfoame maligne 834
— non-Hodgkin 547, 549, 671
Limfoblast 19, 22, 233
Limfocite 19, 232
— B 19, 20, 232
— B de repaus 245
— B virgine 245
— non-N, non-T 240
— „null" 240
— NK 36
— Rieder 257
— T 19, 232, 239, 240
— T activate 251
— Tc 19
— Th 19, 20
— T *helper* 245
Limfocitofereza 685
Limfocitopenie 276
Limfocitoze infecțioase acute 167
— reactive 276
Limfokine 194
— LIF 260
— MIF 260
Limfomul Burkitt 474, 549
— histiocitar „adevărat" 200
Limfopoieza 59
— la adult 242
— normală 241
Limfoproliferări maligne 547
— T 551
Linkage 533
Lipaze 103
Lipidoze 199, 524
Lipoproteinlipază 192
Lipoproteine 298
Litiaza biliară 762, 763, 890
— — pigmentară 719, 795
— renală 890
Lisosomi 148, 214
Livedo reticularis 875
Lizereu Burton 904
— gri-albastru gingival 903
Lizokinaze 385, 386
Lizolecitină 828
Lizozim 148, 184, 192
Loci 487
Locus 516, 523
Locusul HLA 909
Lombalgii 738
Lues 276
Lupus eritematos sistemic 474, 475, 623, 834, 839

M

Macrofage 37, 179, 183, 195
— alveolare pulmonare 187
— fixe 187, 188
— peritoneale 187
— pleurale 187
— tisulare 187, 188
Macroglobulinemie Waldenström 229
Macrotrombocitoza mediteraneană 212
Malabsorbția 657
Malarie 563, 671, 706
Markerii hemolizei intravasculare 861
— megacariocitelor 211
Masă eritrocitară 68
— leucotrombocitară 68
— trombocitară totală 209
Mastocite 169, 195
Mastocitoza micronodulară Unna 175
— pielii 175
— primară 168
— vasculitică Rona-Jadassohn 175
— xantelasmică 175
Mastocitoze agresive 175
— asociate 175
— propriu-zise 175
— reactive 175
— sistemice 175
Măduva osoasă „albastră" 642
— — galbenă 20
— — roșie 20
Mecanismul alloimunizării 858
— coagulării 370
— hemolizei imune 851
Medicamente antifolice 654
— care produc anemii 565
— interzise în perfuzii 897, 898
Megacariocit 20, 202, 207, 642
— bazofil 207
— cu nucleu „în explozie" 210
— granular 207
— matur 204
— trombocitogen 204
Megacarioblast 22, 204, 207
Megaloblastoză 616, 622, 689
Megatrombocite 209, 215
Meioza 533
Melanodermie 913
Melphalan 623, 630
Membrana eritrocitară 78
Membrane hialine 612
Meningita pneumococică 766
Mepacrin 662, 816
Meprobamat 662
6-Mercaptopurină 637, 655
Mesajul genetic 749
Metamielocit 17, 148, 163
Metanefrine 176
Metarubicit 75
Metastaze carcinomatoase 560
Methemoglobina 141, 529, 817, 818
Methemoglobinemie 803
— dobândită 803
— ereditară 517, 524, 529, 803
Metil-cobalamina 632
Metil-dopa 824, 831
Metil-folat 633
Metilprednisolon 683
Metiltiouracil 662
Metoda Maxam—Gilbert 502, 503, 504

Metoda Sanger 502, 503
— Southern-blot 499
Methotrexat 637, 654, 655
Metronidazol 681
Metroragii 669
Mezantoin 662
Mialgii 738
Miastenie 474
Microcitemia familială 780
Microcitoză 568, 614
Micromegacariocite bazofile 210
Microproliferare acută 60
— cronică 60
Microsferocitoză 713
Mielocit 17, 148
— eozinofil 163
Mieloblast 17, 146, 169
Mielodisplazie 64
Mielofibroză 622, 623, 671
Mielom multiplu 229, 506, 623, 671
Mielosclerozâ 671
Mieloza eritemică (di Guglielmo) 655
Migrarea celulelor stem 55
Mijloace de refacere a volemiei 699
Milia 900
Mioglobină 104, 106, 116, 140
Mioston 899
Mioză 806
MIRL 693
Mitomicina C 834, 837
Mitoză 515, 533
— homeoplastică 17
Mixedem 276, 623
Moarte subită 395
Modificări trombotice în HPN 741
Modularea răspunsului imun 533
Monoblaşti 181, 186
Monocite 19, 179, 181, 186
Monocitopenie 198
Monocitoză 198
— falsă 187
— premaligna 198
Monokine 193
Monomeri de fibrină 710
Mononucleoză infecţioasă 226, 662, 824, 827
Mozaic 533
Muramidaza 191
— serică 631
Muşcătura de şarpe 834
Mutaţie 524, 533, 745
Mycobacterium tuberculosis 834
Mycosis fungoides 476
Myleran 666

N

NADP 818
Naftalen 662, 824, 828
Naftalina 816
Napoton 662
Narcolepsin 477
Naşterea prematură 866
Natural Killer 19
Necetigmin 898
Necroze aseptice 767
Nefrita postiradiere 834
Nefropatia IgA 613
Nefroză 607
Neisseria meningococcus 824
Neomicina 638
Neosalvarsan 816
Neoxazol 662
Neuropeptidaze 169
Neuropatia periferică 891
Neutrofile 195
— nesegmentate 148
— segmentate 149
Neutrofilia 157
— adevărată 158
— falsă 158
Neutropenia 63, 158, 739
— adevărată 158
— ciclică 64
— congenitală 64
— falsă 158
Nevrita optică 473
Nicotin-adenin-dinucleotid fosfat 813
Nicotinamid-adenin-dinucleotid fosfat 818
Nimfomania 892
Nitriţi 804, 824
Nitrobenzen 305, 827
Nitrofurantoin 816, 824, 828
Nitrofurazon 816
Nitroglicerina 804
Nitrotoluen 824
Nitrozuree 666
Nomenclatura hemoglobinelor 666
Normoblast 74
— bazofil 74
— ortocromatic 75
— oxifil 75
— policromatofil 75
Northern blot 499
Nucleobaze 488
Nucleotide 488, 491

O

Ocluzie intestinală 892
Oncostatina M 49
Opistotonus 864
Opsonine 155
Opsonizare 854
Organizarea ADN în genom 494
Osmoza 292
Osteitis condensans 200
Osteoclaste 200
Osteomielita 766
Osteopetroza 200, 560
Osteoporoza 671, 762, 789, 915
Ovalocite 92, 558

Ovalocitoza cu „gene tăcute" 724
— — poikilocitoză la nou-născut 725
— — sferocitoză 725
— ereditară 712, 723
Ozena 592
Oxifenilbutazona 664
Oxymetholon 682, 684

P

PADGEM 215
PAF 172, 191, 224
Pancitopenia 739, 818
— Fanconi 227
Pancreatita 834
— acută 890
Parahemofilia Alexander 365
— Owren 365
Paralizia flască simetrică 891
— saturnină 891
Parametrii eritrocitari normali 557
Parathormon 662
Parestezii 639
Pareză vezicală 641
Patogenia anemiilor hipocrome 570
Patologia granulocitelor bazofile 174
— — eozinofile 166
— — neutrofile 157
— hematopoiezei 59
— sistemului monocito-macrofagic 198
— trombocitelor 227
Parvovirus B_{19} 665
PCR 500
PDGF 223
Pedigree 533
Penetrație 529
Penicilină 229, 662, 824, 830
Pentaclorfenol 662
Pentdiopent 145
Peptidaze 189
Perfuzia de sânge 623
Pericardita 795
Peroxidaze 116, 883
— plachetare 211
Pete Gübler 904
Pica 592
Picnocite 94
Picnoză 72
Pinocitoză 725
Pierderi de fier 117, 376
Pionefroză 623
Piramidon 824, 828
Piridoxal-5-fosfat 617
Piridoxină 616, 617, 618, 620, 623, 671
Pirimetamina 654
Pirimidină-5-nucleotidaza 821
Piropoikilocitoza ereditară 99, 522, 528, 563, 706, 712, 725
Piruvatkinaza 125, 706, 812
Plasma 18, 280
Plasmide 501
Plasminogen 387
Plasmoblaşti 233
Plasmocite 20, 233, 234
Plasmocitoze 277
Plasmodium falciparum 82, 762
— *malariae* 824
— *ovale* 824
— *vivax* 824
Platelet factor 4, 207
Platicide 93
Plegomazin 662, 898
Plumb 829
Pneumonia atipică primară 824, 833
— cu *mycoplasma* 876
Poikilocite 92
Poikilocitoza 92, 816
Poliarterita nodoasă 710, 834, 839
Policitemia vera 60, 547, 623, 806
Policromatofilia 817
Polinevrita 625
Poliribosomi 148
Polipi adenomatoşi 583
Poliploidie 277
Polipoză gastrică 643
Polimiozită 839
Polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție 538
Pompa ionică 83
Porfiria 824, 882
— acută intermitentă 529, 882, 888
— cu deficit de AAL dehidrază 882, 894
— cutanată familială 882, 899
— *cutanea tarda* 529, 625, 882, 893, 900
— eritropoietică 529, 623, 882, 884
— variegata 529, 882, 889, 893
Porfirii ereditare 881, 882, 884, 886
— hepatice 882, 898, 899
— secundare 882, 895, 902
Porfobilinogen dezaminaza 889
Polymerase chain reaction 500
Precipitarea proteinelor 301
Precursori eritrocitari 72
Prednison 742, 873, 874
Preparate de calciu 729
— — fier 600, 603
Presiunea coloidosmotică 293
— osmotică 292
Primachin 804, 816, 824, 863
Primidon 662
Proactivator plasmatic 387
Proband 533
Probenecid 816, 824
Procariot 533
Proeritroblast 17, 22, 74
Proeritrocite 76
Prolactină 275
Proliferare celulară 23
— monoclonală 506
— malignă a limfocitelor B 870
Promegacarioblast 204

Promegacariocit 207
Promielocit 17, 147, 172
Promonocite 179, 181, 186
Pronormoblast 74
Properdină 191
Proplasmocite 234
Propanolol 559
Proprietăţile genelor sistemului HLA 443
— proteinelor plasmatice 34, 306
Prorubocit 74
Prostaglandine 169, 191, 275
Prostaciclină 191, 226, 384
Proteaze 191
Proteina benzii 3, 82
— — 4.1 82
— C 381
— γ 143
Proteinele complementului 327, 329
— plasmatice 301
Proteoglicani 169, 173
Proteze valvulare 842, 843
Protopod 155
Protoporfirină 625, 829
Protoporfirinogen oxidaza 893
Protrombină 191
Protrombinaza 368, 370, 372
Pseudogenă 533
Psihonevroze 915
Psoriazis 473
Puncţia albă 670
— biopsie hepatică 917
Punctuaţii bazofile 95
Purpura *fulminans* 843
— trombocitopenică megacariocitară dobândită 675
— trombotică trombocitopenică 710, 758, 834, 838

Q

Quinacrina 824, 828

R

Racephin 682
Radiaţii 276
— ionizante 662
Radiocrom 22
Radiofier 22
RALB 507
RALT 507
Ranitidină 176
Raport lecitină/sfingomielină 866
Răspunsul imun normal 266
— — primar 267
— — secundar 268
RDW 556
Reacţia Ehrlich 892
— de scindare a intronilor 752
Reacţia grefă contra-gazdă 174, 662, 869
— Perls 707
— van den Bergh 144
— Wimplinger 145
Reacţii adverse la tratament cu fier 603
— alergice la medicamente 834
— hemolitice posttransfuzionale 706, 837
Reactiv Ehrlich 144
Reactivitate încrucişată 869
Reagine 259
Rearanjarea genelor RALB 507
— — RALT 507
Recesiv 533
Receptori celulari pentru complement 344
Receptori de membrană 170
Reglarea activării complementului 349
— eritropoiezei 69
— genetică a răspunsului imun 273
— hematopoiezei 70
— megacariocitozei 209
— umorală a răspunsului imun 274
Rejecţia de homogrefă 834
Relaţia grupului sanguin OAB cu anumite boli 411
— haplotipurilor HLA complement cu anumite boli 461
Remodelarea osoasă 174
Renal Erythropoetic Factor 70
Replicarea ADN 493
Resorcinol 804
Retenţie hidrică 863
Reticulocite 17, 18, 76, 526
Reticulocitopenie 739
Reticulocitoză 556, 717, 817
— sanguină 703
Retracţia cheagului 226, 378
Reumatism poliarticular acut 476
Rezecţie gastrică 637
Rezerva alcalină 294
RFLP 497
Ribonuclează 191
Ribosomi 492
Riboză 491
Rifampicină 824, 830
RISA 284
Rofeocitoză 112
Romtiazin 662
Rubiblast 74
Rubicit 75
Ruptura sinusului Valsalva 843

S

Salmonella 824
Sandimmun 684
Saponine 828
Sarcină extrauterină 891
Sarcom Kaposi 474, 476

Sarcoidoza 167, 671
Saturnism 530, 559, 563, 614, 903
Sângele periferic 18
Sângerări ale aparatului digestiv 581
— — — respirator 585
— — — urogenital 584
— prin venesecție 922
Scăderea raportului nucleocitoplasmatic 630
Schizocite 97, 559, 833
Schizocitoză 710
Schizofrenie 517
Sclerodermie 174, 834, 839
Scleroza în plăci 473, 477
Sechestrarea fierului în macrofage 610
Secționarea restrictivă a ADN 495
Secvențe amplificatoare a ADN 491
— represoare a ADN 491
Sediile hemolizei 98
Segmentul Fab 852
Semnul Babinski 641
— Darier 175
Septicemie 834
Septrin 682
Ser antilimfocitar 684
Seria eritrocitară 68
— limfoplasmocitară 232
— megacariotrombocitară 202
— monocito-macrofagică 178
Serotonina 172, 202, 223
Serum-albumina 704
Sfatul genetic 798
Sferocite 93, 558, 828
Sferocitoza 709
— ereditară 90, 559, 563, 706, 710, 712, 713, 720, 721
Siclemia 519, 559, 563, 756, 759
SIDA 64, 227, 277, 474, 710, 826
Sideremie 109, 901
Sideroblaști 739
— inelari 614
— medulari 75
Siderocite 75, 97
Siderofilina 109
Sideromacrofage 920
Silencers 491
Silent thalassaemia 781, 787, 794
Sincopa 892
Sindromul Alport 212, 516
— afectării respiratorii a adultului 163, 834
— Bassen-Kornzweig 729
— Bernard-Soulier 212, 228, 522
— Budd-Chiari 741
— Chediak-Higashi 161, 200, 229
— Churg-Strauss 167
— Criggler-Najjar 144
— de coagulare intravasculară diseminată 559, 710
— — stres hematologic 609
— Di Guglielmo 227
Sindromul Down 546
— Dubin-Johnson 145
— Epstein 229
— Felty 64
— Gilbert 143
— Guillain-Barré 474
— Goodpasture 473, 612, 613
— Gougerot-Sjögren 474
— Hand-Schuller-Christian 199
— hemolitic uremic 710, 834, 836, 838
— hemoragic 64
— Hermansky-Pudlok 229
— hipereozinofilic primar 166
— histiocitelor ca marea 200
— Immerslund 637, 646
— Klinefelter 149
— Lepore 782, 801
— Lesch-Nyhan 655
— leucocitelor leneșe 163
— Löffler 167
— Marchiafava-Micheli 733
— mielodisplazic 60
— mieloproliferativ 60
— Montreal 229
— nefrotic al copilului 474
— Nezeloff 167
— „Pica" 588
— Plummer-Vinson 589, 590, 641
— Raynaud 187, 875
— Reiter 473
— Rosenthal 866
— Shahidi-Nathan-Diamond 571, 605
— Sjögren 799
— trombocitelor gri 229
— trombocitopenic cu absența radiusului 675
— Turner 149
— Wiskott-Aldrich 167, 227, 229
— Zollinger-Ellison 637
Sindroame cu potențial preleucemic 546
— mielodisplazice 546, 694
— talasemice 519, 694, 779, 780, 782
— — minime 801
Sinereza 378
Sinteza de fragmente de ADN 497
— globinei 134
— hemoglobinei 133
— hemului 134
— proteinelor complementului 330
Sistemul celular imun 16
— complement 326, 851
— de membrane de demarcare 211
— Duffy 429, 430
— fagocitelor mononucleare 178, 180
— HLA 438, 470
— inhibitori ai coagulării 379
— Kell 426
— Kidd 431
— Lewis 413
— Lutheran 430

Sistemul macrofagic 178, 851
— major de apărare antimicrobiană 191
— — — histocompatibilitate 438, 442
— MNSsV 423, 424
— NADPH reductaza 809
— OAB 406
— P 420
— reticuloendotelial 25, 178, 179
— Rhesus 414
— Tl 432
Spectrina 80, 128, 714
Splenectomia 684, 713, 721, 743, 768, 797, 820
Splenocite 179
Splenomegalia 176, 592, 660, 671, 713, 716, 738, 739, 762, 786, 789, 820, 839
Spondilita anchilozantă 473, 475
Sprue 638
— *nostras* 651
— tropical 651
Solganal 662
Soluții cristaloide 700
— de dextran 742
Somatostatină 275
Somnolență 806
Southern blot 499
Spur cells 94
Staphylococus 794
Stare leucemoidă eozinofilă 166
Stări duble heterozigote 706, 708
— paranoice 892
Steel factor 40
Stenoza aortică 843
Stercobilina 144
Stercobilinogen 144
Stibofen 706, 830
Stomac operat 582
Stomatita angulară 590
Stomatocite 93, 559
Stomatocitoza ereditară 563, 706, 713, 730
Streptococus 794
Streptokinaza 395
Stromelizină 191
Structura genei 491
Substanța P 50, 275
Substanțe leucotaxice 153
— secretate de macrofage 191
Sulfametin 662
Sulfamide 804
Sulfanilamida 816
Sulfafurazol 816
Sulfataze 192
Sulfatiazol 662
Sulfhemoglobina 141, 807
Sulfapirazonă 842
Sulfisoxazol 816
Sulflonamide 824, 828
Sulfamide 830
Sulfoxone 816

Ş

Şoc anafilactic 603
— caloric 535

T

„Tactoizi" 760
Tabelele Hemmels 471
Tabes 641
Talasemie 94, 558, 559, 563, 598, 781, 794
— γ 801
— minimă 713
— minoră 596
— δ 94, 801
TATA-box 751
Tauredon 862
Tehnica de „fingerprint" 759
— — transmisie TEM 235
— scanning SEM 235
Telangiectazia ereditară 582, 584
— hemoragică ereditară 518, 529
Teoria blocului mucoasei (Granick) 107
— fierului mesager (Crosby) 107
— Lyon 527, 533
Terapia fibrinolitică 395
Testul ADCC 266
— antiglobulină umană 856
— Coombs 611, 709, 710
— — direct 855
— — indirect 855
— cu cianură ascorbat 818
— — ser acidulat 240
— Dacie, Lewis, Tills 740
— de autohemoliză 718, 818, 819
— — excreție a cobaltului 577
— — toleranță a fierului 655
— — siclizare 764
— Donath-Landsteiner 885
— Ham 710, 740
— Hartung-Jenkins 740
— Kleihauer 862, 867
— limfatic 268
— lizei prin anticorpi 740
— Schilling 643, 646
— Watson-Schwarz 892
Tetraclorură de carbon 824, 828
Tetrameri de hemoglobină 136
Thalassaemia africană 781
— major 781
— minimă 787, 790
— minor 780
Tiazide 706
Timidilat-sintetaza 655
Timidina 191
Timina 987
Timocite 36, 248
Timom 662
Timusul 16, 18

Tipuri de aberații cromozomiale 535
— — citotoxicitate 264
— — răspuns imun 270
Tireotoxicoză 623
Tiroidită Hashimoto 474
Tiroidită subacută 473, 480
Transaminaze 901
Transcobalamina I 156
— II 191
— II anormală 647
Transcripția 411
— ADNm primar 751
Transcriptaza inversă 24
Transferina 104, 106, 109, 191
— circulantă 610
Transforming growth factor B 207
Transfuzia 680
— cu eritrocite spălate 742
— — masă eritrocitară 611, 645, 777, 874
— — sânge incompatibil 395
Trepal 662
Trigliceride 296
Trimetroprim-Sulfametazol 662
Trinitrotoluen 662, 804, 816, 828
Triozo-fosfat-izomeraza 127
Triptaza 173
Triptofan 616
Triptofan-pirolaza 883
Tromboastenia 228
— Glanzmann 214, 522
Trombină 217, 368, 370, 373
Trombocite 18, 20, 202, 212
Trombocitopenie 227, 622, 631, 739
— amegacariocitară cu absența radiusului 227, 228
— ereditară 212
Trombocitopoieza 205
Trombocitoze 227
Tromboliză 390
Trombomodulină 385
Trombopatii 227
— ereditare 228
Tromboplastină 191, 385
Trombopoietina 44, 208
Trombospondina 204, 214, 219, 225
Tromboxan A 191, 216, 217, 219, 224
Tromboze profunde 739
— viscerale 766
Translație 491, 810
Transplantul de măduvă osoasă 685, 767, 796
— — rinichi 467
Trasylol 390
Tratamentul acantocitozei 729
— anemiei Addison-Biermer 644
— — aplastice 679
— — diseritropoietice congenitale 695
— — feriprive 599
— — hemolitice autoimune 873
— — — mecanice la cardiaci 844
— — — microangiopatică 842
— — posthemoragie 699
Tratamentul anemiei megaloblastice 658
— — — prin deficit de acid folic 655
— — sideroblastice dobândite 623
— — — ereditare 620
— — — secundare 626
— bolii hemolitice a nou-născutului 864
— hemoglobinopatiilor 656, 759
— hemoglobinuriei de marș 726
— — paroxistice nocturne 742
— hemolizei posttransfuzionale 861
— hemosiderozei pulmonare idiopatice 614
— methemoglobinemiilor 609
— piropoikilocitozei ereditare 726
— porfirinei 888
— — acute hepatice 895
— — cutanate tardive 900
— saturnismului 904
— siclemiei 772
— sindroamelor talasemice 795
Trigger 869, 872
Trypanosoma rhodesiense 824
— *gambiense* 824
Trupanosomiază africană 827
Tobramicină 681
Tolbutamid 662
Toluen 662
Tomanol 662
Torocite 93
Toxicoza gravidică 654
Toxoplasma 700
— gondii 824, 826
Toxoplasmoză 276
Tuberculostatice 623, 624, 654
Tuberculoză 276
— miliară 671
Tulburări de comportament 892
— în resorbția fierului 582
— — sinteza globinei 572
— — — protoporfirinei 571
Tumori intestinale 583

U

Ulcer duodenal 581
— gastric 581, 582
— maleolar 763, 789
— perforat 890
Ulcosilvanil 303
Ultracentrifugare 303
Umbre eritrocitare 391
— nucleare Gumprecht 277
Unitate Svedberg 303
Uracil 491
Uree 297
Uremie 559
Uridină 191
Urobilină 144
Urobilinogen 144
Urobilinogenurie 703

Uropod 155
Uroporfirinogen 885, 889
Urticaria pigmentosa 175
Uveita anterioară 473

V

Valoarea prognostică a anomaliilor cromosomiale 537
Variația dimensiunilor eritrocitelor 556
Valvulopatii 843
Varice esofagiene 583
Vasopresina 217
VLDL 298
VEM 556, 557
Venin de cobra 828
Veninul viperidelor 395
Verminoze intestinale 582
Vibrio cholerae 824
Vicia fava 818
Vincristin 206
VIP 275
Virusul imunodeficienței umane 194
Vitamina B_2 623, 878
— B_6 18, 623
— B_{12} 24, 623, 631, 634, 637, 638, 639, 644, 671
— C 79, 623, 923
— E 797
— K 816
Vitronectina 214
VLA 22
Volumul eritrocitar mediu 556

X

Xerocitoza ereditară 706, 730
Xilen 662

Z

Zigot 515, 533
Zimofren 389